



**Pedro Alexandre Valente Pires**

Licenciado em Biologia

**Implementação e validação da determinação  
de níquel em alimentos por absorção  
atómica de chama**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Sandra Silva, Responsável Técnico, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto Morra

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2017**

2017

Implementação e validação da determinação de níquel em alimentos por absorção atômica de chama

Pedro Pires





**Pedro Alexandre Valente Pires**

Licenciado em Biologia

**Implementação e validação da determinação  
de níquel em alimentos por absorção  
atómica de chama**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Coorientador: Dr.<sup>a</sup> Sandra Silva, Responsável Técnico, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto Morra

Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro 2017**



**“Implementação e validação da determinação de níquel em alimentos por absorção atómica de chama”** Copyright © 2017 de Pedro Alexandre Valente Pires, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma etapa académica que acaba, e a realização deste trabalho só é possível mediante a contribuição de pessoas a quem expresso o meu sincero agradecimento.

Inicialmente, gostaria de agradecer à professora Ana Lúcia Leitão, pela oportunidade da realização deste projeto, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, disponibilidade e empenho demonstrado ao longo desta tese de mestrado.

À SGS, pela disponibilidade de entrar numa empresa de grande importância a nível mundial, que me ofereceu os meios para a realização deste trabalho. Agradeço também a toda a equipa do laboratório e à minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Sandra Silva pelos conhecimentos que me passaram, pelo acolhimento e pelo esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos de longa data e aos que surgiram no decorrer destes anos, agradeço a paciência de me aturarem, a capacidade de me ouvirem e o apoio que sempre me deram.

Aos meus irmãos, obrigado por estarem sempre comigo, nos bons e maus momentos.

E por último e mais importante, à minha mãe, por me ter transmitido os valores mais importantes da vida e que fez de mim a pessoa que sou hoje sou. Obrigado por me teres ensinado a prosseguir o que quero até ao fim, por mais difícil que seja o caminho a percorrer e a nunca desistir daquilo em que acredito.

Um sincero obrigado a todos!





## RESUMO

O níquel é um metal amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no ar, na água, no solo e, portanto, também pode estar presente nos alimentos. Para além disso, o níquel é um elemento altamente reativo e interfere de forma positiva e negativa com uma variedade de processos metabólicos de organismos vivos. Dentro dos métodos utilizados para a determinação de metais, a espectrofotometria de absorção atômica de chama é capaz de determinar a presença e quantidade de níquel na solução, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta pelos átomos no seu estado atômico livre. De forma a monitorizar a presença do níquel nos alimentos, o objetivo do presente trabalho foi implementar e validar o método de determinação de níquel por absorção atômica de chama, a partir de análises de sensibilidade, precisão e exatidão. O método estudado, foi implementado no laboratório da SGS - *Société Générale de Surveillance*, sendo possível a validação nas matrizes de cereais e hortofrutícolas pois possui elevada precisão e sensibilidade nos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Níquel, absorção atômica de chama, alimentos, validação, análise quantitativa.



## ABSTRACT

Nickel is a metal widely distributed in nature and can be found in air, water, soil and therefore may also be present in food. In addition, nickel is a highly reactive element and interferes positively and negatively with a variety of metabolic processes of living organisms. Within the methods used for the determination of metals, flame atomic absorption spectrophotometry can determine the presence and amount of nickel in the solution, using as a principle the absorption of ultraviolet radiation by the atoms in their free atomic state. To monitor the presence of nickel in food, the objective of the present work was to implement and validate the method of determination of nickel by atomic absorption of flame, based on analyses of sensitivity, precision and accuracy. The method studied, was implemented in the laboratory of SGS - *Société Générale de Surveillance*, being possible the validation of the cereal and vegetable matrices, because it has high precision and sensitivity in the obtained results.

**Keywords:** Nickel, flame atomic absorption, food, validation, quantitative analysis.



## ÍNDICE DE MATÉRIAS

ENQUADRAMENTO .....	1
1. SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE (SGS) .....	3
1.1 A EMPRESA .....	3
1.2 HISTÓRIA .....	3
1.3 SERVIÇOS.....	3
2. NÍQUEL.....	5
2.1 CARATERÍSTICAS PRINCIPAIS .....	5
2.2 FONTES DE NÍQUEL .....	5
2.3 EXPOSIÇÃO AO NÍQUEL .....	6
2.4 EFEITO DO NÍQUEL NA SAÚDE.....	8
2.5 LEGISLAÇÃO .....	10
3. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	11
3.1 ESCOLHA DO MÉTODO ANALÍTICO .....	11
3.2 ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÓMICA DE CHAMA .....	12
3.2.1 INTERFERÊNCIAS .....	13
3.2.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS.....	14
4. VALIDAÇÃO E CONTROLO DA QUALIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	17
4.1 PARÂMETROS ESTUDADOS NO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	17
4.1.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO .....	17
4.1.2 GAMA DE TRABALHO .....	18
4.1.3 TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS.....	18
4.1.4 LINEARIDADE .....	19
4.1.5 LIMITE DE DETEÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	20
4.1.6 PRECISÃO .....	22
4.1.6.1 REPETIBILIDADE .....	22
4.1.6.2 REPRODUTIBILIDADE .....	23
4.1.6.3 PRECISÃO INTERMÉDIA .....	24
4.1.7 EXATIDÃO .....	24
4.1.7.1 ENSAIOS INTERLABORATORIAIS.....	24
4.1.7.2 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS .....	25
4.1.7.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....	25
4.2 CONTROLO DA QUALIDADE INTERNO .....	25
4.2.1 ENSAIO EM BRANCO .....	25

4.2.2	ENSAIOS EM DUPLICADO .....	26
4.2.3	ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO .....	26
5.	PARTE EXPERIMENTAL .....	27
5.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	27
5.2	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	27
5.3	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DE CONTROLO .....	27
5.4	AMOSTRAS .....	27
5.4.1	AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	27
5.4.2	AMOSTRAS ANALISADAS SEGUNDO O MÉTODO VALIDADO .....	28
5.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	28
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
6.1	LINEARIDADE .....	29
6.2	REGISTO DE BRANCOS E LIMIARES ANALÍTICOS .....	30
6.3	TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS .....	31
6.4	CONTROLO DA SENSIBILIDADE.....	32
6.5	PADRÕES DE CONTROLO .....	34
6.6	ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO.....	36
6.7	CONTROLO DE DUPLICADOS.....	36
6.8	REPETIBILIDADE .....	37
6.9	PRECISÃO INTERMÉDIA.....	38
6.10	EXATIDÃO .....	39
6.11	ANÁLISE DAS AMOSTRAS SEGUNDO O MÉTODO VALIDADO .....	44
7.	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Logo da SGS (SGS, 2017c) .....	3
Figura 2.1 – Dermatite endógena induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso <i>et al.</i> , 2004).....	9
Figura 3.1 – Espectrofotómetro de absorção atômica de chama. ....	13
Figura 6.1 – Curva de calibração para o níquel .....	29
Figura 6.2 – Carta de controlo das curvas de calibração .....	33
Figura 6.3 – Representação gráfica do controlo do padrão de 0,100 mg/L para o níquel.....	35
Figura 6.4 – Representação gráfica do controlo do padrão de 1,00 mg/L para o níquel .....	35





## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 6.1 – Valores da curva de calibração .....	29
Tabela 6.2 – Registo dos brancos nos diferentes dias de análise .....	30
Tabela 6.3 – Limites de Detecção e Quantificação para as retas estudadas por emissão de chama .....	31
Tabela 6.4 – Teste de homogeneidade de variâncias no dia 30 de maio de 2017 .....	32
Tabela 6.5 – Análise da sensibilidade para o Ni, para um nível de confiança de 95% .....	33
Tabela 6.6 – Controlo do padrão controlo de 0,100 mg/L .....	34
Tabela 6.7 – Controlo do padrão controlo de 1,00 mg/L .....	34
Tabela 6.8 – Ensaio de recuperação das amostras com Ni .....	36
Tabela 6.9 – Controlo dos duplicados das amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni .....	37
Tabela 6.10 – Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade (r) para as matrizes de cereais e hortofrutícolas hortofrutícolas com amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni .....	38
Tabela 6.11 – Precisão intermédia para as matrizes de cereais e hortofrutícolas com amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni .....	39
Tabela 6.12 – Ensaio de recuperação com 0,150 ppm de Ni em cereais .....	40
Tabela 6.13 – Ensaio de recuperação com 0,150 ppm de Ni em hortofrutícolas .....	40
Tabela 6.14 – Ensaio de recuperação com 0,300 ppm de Ni em cereais .....	41
Tabela 6.15 – Ensaio de recuperação com 0,300 ppm de Ni em hortofrutícolas .....	42
Tabela 6.16 – Ensaio de recuperação com 0,600 ppm de Ni em cereais .....	42
Tabela 6.17 – Ensaio de recuperação com 0,600 ppm de Ni em hortofrutícolas .....	43
Tabela 6.18 – Ensaio interlaboratorial .....	43
Tabela 6.19 – Ensaio de recuperação das amostras com Ni .....	44
Tabela 6.20 – Controlo dos duplicados das amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni .....	44



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorvância

C – Concentração

CV – Coeficiente de Variação

CVr – Coeficiente de variação da repetibilidade

DS<sup>2</sup> – Diferença de Variâncias

EIL – Ensaio interlaboratorial

FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica de chama

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com câmara de grafite

HGAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com gerador de hidretos

ICP-AES – Espectrometria de Emissão com plasma indutivo

ICP-MS – Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MRC - Material de referência certificado

Ni – Níquel

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

ppt – Partes por tonelada

r – Limite de repetibilidade

R<sup>2</sup> – Coeficiente de Correlação

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SI – Sistema Internacional de Unidades

S – Desvio padrão

S<sup>2</sup> – Variância

SGS – Société Générale de Surveillance

V – Volume



## ENQUADRAMENTO

O níquel está amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no ar, na água, no solo e, portanto, também pode estar presente nos alimentos (Duda-Chodak & Blaszczyk, 2008).

Todavia, o níquel é um elemento reativo interferindo com uma variedade de processos metabólicos de organismos vivos (Spiewak *et al.*, 2007).

A importância nutricional ou função bioquímica do níquel em seres humanos não foi claramente estabelecida, atualmente, o nível máximo de ingestão tolerável para o níquel é baseado em dados de animais. No entanto, a análise de dados indicou a necessidade de continuar o estudo deste elemento para determinar papéis metabólicos específicos, identificar indicadores sensíveis e permitir uma caracterização mais completa sobre as funções do níquel na saúde humana (Denkhaus & Salnikow, 2002, Spiewak *et al.*, 2007).

A prevalência de sensibilidade ao níquel está a aumentar e a alergia alimentar causada pelo níquel foi detetada quando os dermatologistas perceberam que algumas pessoas exibiam sintomas de dermatite em superfícies de pele quando não tinham estado em contato com nenhum alérgeno conhecido (Carrapatoso *et al.*, 2004).

O nível de níquel nos alimentos varia com a variedade das espécies de plantas e com o teor de níquel do solo em que a planta foi cultivada ou, no caso dos frutos do mar, do meio aquático. No entanto, as fontes mais ricas de níquel são encontradas em nozes, ervilhas e feijões, grãos integrais e chocolate (Peeters *et al.*, 2017).

Além disso, o processamento de um alimento pode aumentar o seu teor de níquel. Por exemplo, pequenos traços de níquel de moedores de metal usados na farinha de moagem podem aumentar consideravelmente o teor de níquel na farinha, e utensílios de aço inoxidável aumentaram o níquel nos alimentos cozidos (Duda-Chodak & Blaszczyk, 2008).

A maioria do níquel ingerido permanece sem ser absorvido e é excretado nas fezes. Geralmente, menos de 10% do níquel nos alimentos é absorvido, mas essa quantidade aumenta em pessoas com deficiências de ferro e em mães lactantes (Peeters *et al.*, 2017).

O níquel e o ferro usam o mesmo sistema de transporte para atravessar a mucosa intestinal; então, se o ferro for transportado, o níquel é excluído. Consequentemente, indivíduos que são sensíveis ao níquel devem incluir alimentos ricos em ferro na sua dieta (Anke *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo desta tese de mestrado é implementar e validar um método de determinação de níquel nos alimentos para se obter uma melhor perspectiva sobre o teor de níquel nos produtos alimentares.

Foi utilizada a espectrofotometria de absorção atômica de chama para essa determinação porque se trata de um método analítico que é rápido, automático quando se trata de analisar um elemento e é uma técnica analítica bastante útil na determinação de metais vestigiais como o Ni, devido à sua elevada especificidade (Carasek, 2000).



## 1. SOCIÉTÉ GÉNÉRALE DE SURVEILLANCE (SGS)

### 1.1 A EMPRESA



A SGS é líder mundial em inspeção, verificação, testes e certificação (Figura 1.1). São reconhecidos como referência mundial em qualidade e integridade e atualmente contam com mais de 90.000 funcionários e operam uma rede com mais de 2.000 escritórios e laboratórios em todo o mundo (SGS, 2017c).

Figura 1.1 - Logo da SGS (SGS, 2017c)

### 1.2 HISTÓRIA

Estabelecida em 1878, a SGS transformou o comércio de grãos na Europa, oferecendo serviços inovadores de inspeção agrícola. Em 1915, durante a 1ª Guerra Mundial, a sede da empresa passou de Paris a Genebra, na Suíça, por este ser considerado um país neutro. Em 1919, a Empresa foi registrada em Genebra como *Société Générale de Surveillance* (SGS, 2017a).

Desde o início que continua a crescer e os serviços de inspeção agrícola continuam a espalhar-se por todo o mundo. Nos meados do século XX, começou a diversificar e a oferecer serviços de inspeção, testes e verificação em vários setores, como o industrial, mineral, petrolífero, gás e químico. Em 1985, a SGS passou a ser cotada na Bolsa de Valores Suíça, alcançando uma reputação enquanto líder na procura de soluções para os desafios enfrentados diariamente pelas organizações (SGS, 2017a).

Os serviços de consultoria, *outsourcing* e formação complementam as principais competências de inspeção, verificação, testes e certificação em todos os setores de atuação da empresa. Através da rede global, fornecem resultados independentes e adaptados às necessidades específicas de cada indústria ou setor (SGS, 2017c).

### 1.3 SERVIÇOS

Os principais serviços realizados pela SGS podem ser divididos em quatro categorias (SGS, 2017b; SGS, 2017c):

- Inspeção: para controlar a quantidade e a qualidade dos bens comercializados na etapa de transbordo de forma a cumprir todos os requisitos regulamentares relevantes das diferentes regiões e mercados;

- Testes: permite reduzir riscos, agilizar a atuação no mercado e testar a qualidade, a segurança e o desempenho de seus produtos, de acordo com as normas regulamentares relevantes de saúde e segurança;
- Certificação: para demonstrar que os produtos, processos, sistemas ou serviços estão em conformidade com as normas e regulamentações nacionais e internacionais ou com as normas definidas pelo cliente, através de certificações;
- Verificação: assegurar que os produtos e serviços estejam em conformidade com as normas globais e as regulamentações locais.

A SGS oferece serviços em 11 grandes setores através de 9 áreas de negócio. Cada área de negócio desenvolve e mantém uma experiência de classe mundial para apoiar as necessidades dos consumidores ao longo dos tempos (SGS, 2017b).

No setor agroalimentar a SGS atua de forma a garantir alimentos seguros, sustentáveis e de alta qualidade. Os consumidores querem garantias de segurança e qualidade em todas as etapas do processo de produção dos alimentos. Portanto, os serviços da SGS dão segurança, reduzem o risco e mantêm a eficiência em várias redes de fornecimento. Têm soluções para produtos agroquímicos, sementes, biocombustíveis, fertilizantes, alimentos e para a indústria florestal. Da produção primária ao consumo, a SGS verifica o armazenamento, transporte, embalagem e distribuição, assim como a importação e exportação de produtos de inspeção (SGS, 2017b).



## 2. NÍQUEL

### 2.1 CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS

O níquel é um elemento químico, com o símbolo químico Ni e o 28º elemento na tabela periódica. É um metal branco prateado que pode ser encontrado em vários estados de oxidação. Este metal existe na natureza em partículas insolúveis, em fumos e poeiras, como sulfitos, óxidos e silicatos de níquel, ou em compostos de níquel solúveis em água, como o acetato, cloreto e sulfato de níquel (Merian, 1984).

Os compostos de níquel solúveis e insolúveis também são encontrados nos solos e nas águas. Na água, os íons de níquel são geralmente divalentes. As propriedades físicas e químicas únicas do níquel como a baixa condutividade térmica e elétrica, alta resistência à corrosão e oxidação, excelente resistência e dureza em temperaturas elevadas e capacidade de magnetização - tornam este metal e seus compostos, materiais adequados para muitas aplicações amplamente encontradas na indústria moderna (Lu *et al.*, 2005).

O Ni é um elemento essencial para os seres vivos, porque é um componente estrutural de certas metaloenzimas, funcionando como centro ativo. Também está envolvido no metabolismo do ferro em seres humanos (Nielsen, 1984; Cempel & Nikel, 2006; Wittsiepe *et al.*, 2009).

### 2.2 FONTES DE NÍQUEL

O níquel é amplamente distribuído na natureza, formando cerca de 0,008% da crosta terrestre e pode ser encontrado no ar, na água e no solo. As fontes naturais de níquel atmosférico incluem poeiras provenientes de emissões vulcânicas e a erosão de rochas e solos. O nível de níquel no ar é de cerca de 6 a 20 ng/m<sup>3</sup> mas podem chegar até 50 ng/m<sup>3</sup> em zonas contaminadas por fontes antropogênicas (Duda-Chodak & Blaszczyk, 2008).

Na água, o níquel deriva de ciclos biológicos e solubilização de compostos de níquel a partir de solos, bem como da sedimentação de níquel da atmosfera. A água não contaminada geralmente contém cerca de 300 ng/m<sup>3</sup> de Ni. Os solos agrícolas contêm aproximadamente 3-1000 mg de Ni por kg de solo, mas a concentração pode atingir até 24 000-53 000 mg de Ni por kg de solo perto de refinarias de metais e em lodo seco, respectivamente. A pH inferior 6,5, os compostos de níquel no solo são relativamente solúveis, enquanto que a pH superior 6,7, a maioria do níquel existe como hidróxidos insolúveis (Barceloux & Barceloux, 1999; Denkhauß & Salnikow, 2002).

A maioria da produção de níquel é utilizada para a criação de aço inoxidável, ligas de níquel e ferro fundido de níquel que compõem objetos, como moedas, equipamentos elétricos, ferramentas, máquinas, armamentos e utensílios domésticos. Os compostos de níquel são usados também para

galvanoplastia, eletroformação, baterias alcalinas de níquel-cádmio, mordentes de corantes, catalisadores e equipamentos eletrônicos. As ligas que contém níquel incluem metais não preciosos, aço cirúrgico (0,5-30% Ni), ouro branco (10-15% Ni), prata alemã (10-15% Ni), soldas, revestimento de ouro duro e prata esterlina. Algumas atividades industriais, como fusão e soldagem de metais, bem como incineração de resíduos municipais são processos que contribuem para a liberação de metais pesados no ambiente e desta forma podem constituir um fator perigoso para a saúde humana (Duda-Chodak & Blaszczyk, 2008; De Toni *et al.*, 2017).

## 2.3 EXPOSIÇÃO AO NÍQUEL

A exposição humana ao níquel ocorre principalmente por inalação, ingestão e absorção dérmica. O níquel em partículas insolúvel entra nas células vertebradas por fagocitose, enquanto que o carbonilo de níquel é solúvel em lipídios permeando a membrana plasmática (Denkhaus & Salnikow, 2002).

O níquel solúvel é transportado para células de organismos vertebrados por difusão ou através de canais de cálcio e/ou transportadores de cátions divalentes (DMT-1) envolvidos na absorção de ferro (Barceloux & Barceloux, 1999). O transporte de níquel no plasma sanguíneo é mediado pela ligação à albumina e a alguns ligandos, tais como aminoácidos (por exemplo, histidina) e peptídeos pequenos (Asato *et al.*, 1975). O complexo  $Ni^{2+}$ -L-histidina é a principal forma de transporte de níquel através da membrana celular, e o complexo  $Ni^{2+}$ -albumina é a forma de transporte sistêmico (Glennon & Sarkar, 1982).

As concentrações médias de níquel total na água potável variam de 3-7  $\mu\text{g/L}$ , mas aumentam se os reservatórios de água contêm um revestimento de níquel corroído. A primeira água extraída de torneiras de água quente revestidas com níquel pode conter concentrações entre 1 a 1,3  $\text{mg/L}$  (Barceloux & Barceloux, 1999).

Além disso, alguns aparelhos domésticos contêm ligas de níquel. Os testes das chaleiras da cozinha mostraram lixiviação substancial de níquel na água quando se atingiam temperaturas de cozedura em chaleiras com revestimento de níquel (Duda-Chodak & Blaszczyk, 2008).

As fontes de alimento ricas em Ni incluem flocos de aveia (1  $\text{mg/kg}$ ), caju torrados (até 5  $\text{mg/kg}$ ), cacau (até 12  $\text{mg/kg}$ ), chocolate (até 6  $\text{mg/kg}$ ), chá preto (5  $\text{mg/kg}$ ), avelãs (4  $\text{mg/kg}$ ), amêndoas (0,8  $\text{mg/kg}$ ) produtos de soja (2-6  $\text{mg/kg}$ ), legumes (2  $\text{mg/kg}$ ), mexilhões (até 3  $\text{mg/kg}$ ). Comer e beber esses produtos em maiores quantidades pode aumentar a ingestão diária de Ni até 900  $\text{mg}$  (Peeters *et al.*, 2017).

Também a administração de medicamentos contaminados com níquel (por exemplo, albumina, fluidos de hemodiálise) leva a exposições significativas a este elemento (McGregor *et al.*, 2000; Kasprzak *et al.*, 2003).

A quantidade de níquel absorvida durante os procedimentos médicos depende da composição do equipamento em contato com o sangue e fluidos corporais. Por exemplo, a absorção estimada de níquel durante um procedimento de diálise típico na década de 1980 era de 100 mg de Ni por tratamento (Sunderman, 1983).

O níquel induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCl). Em última análise, causa apoptose em vários tipos celulares, incluindo neutrófilos humanos e células T (Au *et al.*, 2006, Freitas *et al.*, 2013). A alta exposição ao níquel prejudica a homeostase dos íons metálicos essenciais, diminuindo os níveis de cálcio, magnésio, manganês e zinco em diferentes tecidos e possivelmente interferindo com a ligação normal do cofator de ferro a proteínas específicas (Anke *et al.*, 2002).

As preocupações mais graves do níquel para a saúde humana são a teratogenicidade e a carcinogênese induzidas pelo níquel, contudo, o níquel desempenha um papel fundamental nos organismos vivos, revelando sua natureza de dupla face como elemento essencial e tóxico. A importância do níquel para plantas, bactérias, arqueias e eucariotas unicelulares está bem documentada. Nestes organismos, a escolha do níquel como catalisador de importantes reações biológicas está relacionada com a sua geometria de coordenação flexível, o que torna este metal um elemento muito versátil para muitas aplicações biológicas (Zambelli & Ciurli, 2013).

O níquel é um componente necessário no centro ativo de várias metaloenzimas essenciais em bactérias e eucariotas inferiores. Até ao momento, foram identificadas oito enzimas microbianas contendo níquel, que incluem urease, hidrogenase, CO desidrogenase, acetil-CoA sintase, metil-CoM redutase, Ni-superóxido dismutase, dioxigenase de *Klebsiella* e glioxalase I, enquanto algumas outras possíveis enzimas dependentes de níquel estão a surgir (Li & Zamble, 2009).

A maioria das enzimas dependentes de níquel conhecidas foram determinadas estruturalmente e os íons de níquel demonstraram desempenhar um papel essencial na sua catálise enzimática. Em eucariotas superiores, a única enzima conhecida dependente de níquel é a urease vegetal. Algumas espécies de plantas que vivem em solos serpentinos evoluíram para acumular íons de níquel, criando sistemas complexos de desintoxicação de metais e homeostasia que constituem sistemas atraentes para a fitorremediação de ambientes contaminados (Yusuf *et al.*, 2011).

Muitas experiências em modelos animais mostraram que o níquel poderia ser benéfico, se não essencial, para uma função reprodutiva ótima, composição e força óssea, metabolismo energético e função sensorial. Os motivos desta essencialidade permanecem obscuros, mesmo que algumas hipóteses tenham sido sugeridas (Denkhaus & Salnikow, 2002).

## 2.4 EFEITO DO NÍQUEL NA SAÚDE

Os efeitos perigosos mais divulgados no âmbito da saúde causados pela exposição ao níquel são a carcinogénese e a alergia induzidas por níquel. Ambos são mediados por mudanças ativas nas vias metabólicas subjacentes à inflamação, resposta ao stresse, stresse oxidativo, proliferação celular e morte celular. Como nenhuma proteína específica para a homeostase do níquel é conhecida em mamíferos, não se esperaria uma mudança específica de medição do níquel na expressão e no metabolismo dos genes (Kasprzak *et al.*, 2003).

A exposição a compostos de níquel produz uma variedade de efeitos adversos para os seres humanos. A reação imune do níquel, como uma forma de dermatite, é uma das alergias mais comuns no mundo moderno (Torres *et al.*, 2009). Além disso, a exposição crónica ao níquel pode produzir doenças graves respiratórias, cardiovasculares e renais. Algumas alterações na resposta imunológica em modelos animais foram observadas como resultado do contato com níquel (Schiffer *et al.*, 1991).

Contudo, a resposta celular ao níquel está relacionada com cascatas de transdução de sinal, como os segundos mensageiros, proteínas cinases, fosfatases ou fatores de transcrição, que estão envolvidos na resposta geral a iões metálicos. Notavelmente, a exposição ao níquel produz um padrão bastante específico de expressão génica. A alteração do níquel na transcrição de genes envolvidos na deficiência de oxigénio tem sido amplamente estudada *in vitro* pela sua relevância para a carcinogénese do níquel (Kasprzak *et al.*, 2003).

Apesar dos seus efeitos carcinogénicos, o níquel demonstra muito baixa ou nenhuma mutagenicidade na maioria dos ensaios mutacionais. Em vez disso, a carcinogenicidade do níquel tem sido amplamente atribuída aos seus efeitos sobre as modificações epigenéticas e a expressão dos genes através da inibição de dioxigenases dependentes de ferro e 2-oxoglutarato (Scanlon *et al.*, 2017).

A toxicidade do níquel, potencialmente fatal como resultado da ingestão oral de níquel parece bastante improvável. A extrapolação de experiências com animais sugere que seria necessária a ingestão de mais de 250 mg de níquel solúvel por dia, para produzir sintomas tóxicos em humanos. No entanto, para as pessoas que são expostas ao níquel transportado por via aérea (fumos, aerossóis ou poeiras), há um risco aumentado de cancro do pulmão (Spiewak *et al.*, 2007).

Todavia, uma dose oral de até 300 µg de níquel, que é a quantidade equivalente à contida numa dieta diária normal, é capaz de induzir uma reação cutânea inflamatória (dermatite) (Figura 2.1), em pessoas mais sensíveis (Jensen *et al.*, 2003).

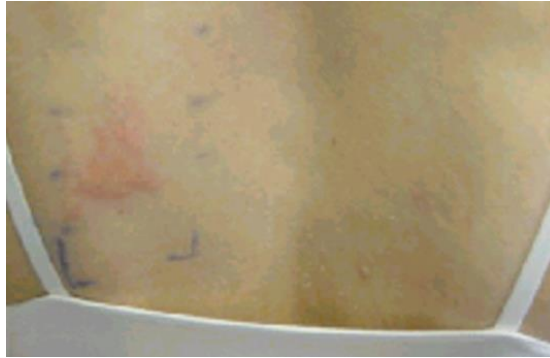


Figura 2.1 - Dermatite endógena induzida pela ingestão de níquel (Carrapatoso *et al.*, 2004).

A alergia ao níquel é mais comum no sexo feminino, com uma prevalência aproximada de 15-20%. Esta maior prevalência está, provavelmente, relacionada com a utilização frequente de brincos e outras peças de adorno que permite um contacto íntimo e continuado do níquel com a pele (Carrapatoso *et al.*, 2004).

A frequência de alergias ao Ni está a crescer e os dermatologistas chamam a atenção para reconhecer e examinar todas as fontes de exposição humana ao Ni. Por conseguinte, é importante determinar o teor total de Ni nos géneros alimentícios (Li *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2017; Scanlon *et al.*, 2017).

Atualmente, a produção de óleo hidrogenado aumentou consideravelmente na indústria dos alimentos, na qual o níquel metálico é utilizado como catalisador (Li *et al.*, 2002).

Determinar o teor total de Ni nos alimentos é geralmente insuficiente, não só porque o níquel pode ter origem em várias fontes de poluição ambiental mas também porque a biodisponibilidade do Ni depende principalmente das espécies químicas presentes nos alimentos, sendo o catião  $\text{Ni}^{2+}$  considerado a espécie mais biodisponível. Apenas 1 a 10% do Ni ingerido é absorvido e a maior parte é excretada pelos rins ou perdida pelo suor (Peeters *et al.*, 2017).

A sensibilização ao níquel é uma grande preocupação de saúde pública devido à sua alta prevalência e à ampla presença de níquel na vida diária. O diagnóstico clínico de alergia ao níquel é relativamente simples e confiável, contudo ainda não está disponível um teste de triagem simples. Até à data, aumentar a conscientização pública sobre o problema parece ser o único meio efetivo disponível para diminuir a prevalência de alergia ao níquel (Spiewak *et al.*, 2007; Peeters *et al.*, 2017).

## 2.5 LEGISLAÇÃO

Até 65 milhões de cidadãos europeus podem ser alérgicos ao níquel, uma substância abundantemente presente no quotidiano. Desta forma, o Parlamento Europeu e o Conselho Europeu emitiram, em 30 de junho de 1994, a Diretiva 94/27/CE apelidada de "Diretiva do Níquel" que acrescentou o níquel à lista de substâncias perigosas e impôs restrições à comercialização e utilização de níquel na União Europeia. Os regulamentos entraram em vigor em julho de 2001.

Em 2016 saiu a Recomendação (UE) 2016/1111 da Comissão, de 6 de julho de 2016, sobre a monitorização do níquel nos alimentos, porque até ao momento não existia nenhum regulamento para este tipo de controlo.

As razões pela qual decidiram fazer esta recomendação foram, em primeiro lugar, devido ao níquel ser um metal abundante na superfície da Terra, e, portanto, está presente nos alimentos e na água potável devido às atividades naturais e antropogénicas (UE, 2016).

Em segundo lugar, adotou o Parecer Científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de níquel nos alimentos e na água potável e esse parecer identificou a toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento como o efeito crítico para a caracterização dos riscos da exposição oral crónica ao níquel. Reações recrudescentes de eczema e agravamento de reações alérgicas foram identificados como o efeito crítico para a exposição oral aguda ao níquel de humanos sensíveis ao níquel (UE, 2016).

Finalmente, para certos grupos de alimentos, considerados como os principais contribuintes para a exposição alimentar no parecer científico da AESA, apenas estavam disponíveis dados limitados relativos à ocorrência (UE, 2016).

Desta forma, seria aconselhável uma melhor perspetiva sobre o teor de níquel nos produtos alimentares.

### 3. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS

Existem vários métodos para determinar metais, desde métodos gravimétricos, potenciométricos, espectrofotométricos de absorção molecular entre outros. No entanto exigem tempo e recursos humanos intensivos, e os seus limites de detecção não respondem às exigências impostas na atualidade. Hoje em dia, podemos contar com métodos analíticos rápidos e sensíveis sendo alguns multi-elementais (Van Loon, 1985).

Assim, estes métodos têm sido substituídos por métodos instrumentais como a espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS), com câmara de grafite (GFAAS) e com gerador de hidretos (HGAAS), a espectrometria de emissão com plasma indutivo (ICP-AES), a espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), entre outros. Os métodos instrumentais, apesar de exigirem um forte investimento em equipamento de custo elevado, o qual é amortizado pela poupança em recursos humanos (devido à automatização) e reagentes, permitem alargar a escala de concentração dos elementos até níveis da ordem de grandeza dos ppm, ppb ou mesmo ppt (Van Loon, 1985; Bayrak *et al.*, 2017).

#### 3.1 ESCOLHA DO MÉTODO ANALÍTICO

A escolha do método analítico apropriado para a caracterização das amostras em estudo foi realizada de forma criteriosa, tendo em consideração alguns dos seguintes fatores (Slavin, 1992):

- o tipo de informação que se pretendia obter;
- a quantidade de amostra disponível e a proporção do(s) constituinte(s) a analisar;
- a exatidão e a precisão do método analítico;
- as interferências analíticas e o seu controlo;
- as dificuldades com possíveis contaminações;
- o tempo necessário para analisar cada amostra;
- o custo da análise de cada elemento por amostra.

Cada método possui um campo de aplicabilidade mais ou menos específico e, para que a sua utilização seja a mais adequada, é fundamental o conhecimento dos princípios dos fenómenos físicos presentes, as vantagens e, sobretudo as limitações mais relevantes de cada um deles, de forma a serem criadas as condições experimentais necessárias para a sua aplicação.

Na FAAS, a amostra, previamente convertida num fino aerossol, é introduzida na mistura de gases que alimentam a chama produzida num queimador laminar. As tentativas de minimizar as elevadas perdas de amostra durante a fase de nebulização e o reduzido tempo de permanência dos átomos na chama, condicionam drasticamente a sensibilidade do método, tornando-o inadequado

para aplicações quantitativas na gama dos ppb. Este método apresenta, portanto, limites de detecção demasiado altos para algumas aplicações (Skoog *et al.*, 2002; Bayrak *et al.*, 2017).

O ICP-AES dispõe de um sistema de detecção de radiação que permite determinar, numa só amostra e rapidamente, um elevado número de elementos. Os limites de detecção que se conseguem atingir são da mesma ordem de grandeza ou um pouco inferiores aos conseguidos por FAAS, mas mais elevados do que os alcançados com GFAAS (Berg *et al.*, 1995; Zhong *et al.*, 2016).

Podemos afirmar que o ICP-AES tem vantagens reais sobre a AAS quando existe um processamento de um grande número de amostras e determinação de vários elementos em cada amostra. Além disso, o ICP-AES tem ainda sobre a FAAS a vantagem de permitir a obtenção de melhores limites de detecção para elementos refratários (por exemplo: alumínio, titânio, zircónio) (Skoog *et al.*, 2002).

Em contrapartida, o ICP-AES tem a desvantagem de ser uma técnica menos adequada à determinação dos elementos mais voláteis (como: arsénio, bismuto, germânio, índio, chumbo, antimónio, selénio, estanho e telúrio), sendo estes analisados por HGAAS. Também, os limites de detecção obtidos para elementos do grupo I (por exemplo: sódio, potássio) são, geralmente, melhores por FAAS do que por ICP-AES. A técnica de ICP-AES tem boa aplicabilidade na análise de elementos como o boro, o berílio, o lítio, o fósforo, o enxofre e o silício (Berg *et al.*, 1995; Bayrak *et al.*, 2017).

No campo económico, o custo da instrumentação do ICP-AES é mais elevado do que a de AAS, sobretudo o sistema de operação que é bastante mais dispendioso, principalmente devido ao consumo de argon (13-18 L/min) (Berg *et al.*, 1995; Slavin, 1992; Skoog *et al.*, 2002).

### **3.2 ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÓMICA DE CHAMA**

A Espectrofotometria de Absorção Atômica de chama é uma das técnicas mais utilizadas para efetuar a determinação quantitativa de metais (Xu *et al.*, 2013).

É uma técnica de análise quantitativa que consiste em determinar a presença e quantidade de um determinado metal numa solução, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta pelos átomos no seu estado atómico livre. Os eletrões sofrem um salto quântico depois de devidamente excitados, por uma fonte de energia, na forma de chama por combinação de dois gases, por exemplo, o acetileno e, como comburente pode ser usado o ar ou o óxido nitroso ( $N_2O$ ). No caso da espectrometria de absorção atômica de chama, os eletrões devolvem a energia recebida para o meio, voltando assim para a sua orbital de origem.



A energia emitida pela lâmpada só pode ser absorvida pelos átomos do elemento da lâmpada em questão, pois como os saltos de energia dos elétrons estão quantizados, só os que correspondem ao material da lâmpada é que podem absorver essa energia. Sendo a absorção atômica regida pela Lei de Lambert-Beer, a resposta obtida será linear.

$$A = C \times l \times \varepsilon$$

Onde A é a absorvância (adimensional), C é a concentração da espécie em solução ( $\text{mol m}^{-3}$ , no SI), l é a distância percorrida pela radiação através da solução (m, no SI),  $\varepsilon$  é o coeficiente de absortividade molar da espécie em estudo ( $\text{m}^3 \text{mol}^{-1} \text{m}^{-1}$ , no SI).

O espectrofotômetro de absorção atômica de chama utilizado neste trabalho encontra-se na Figura 3.1.



Figura 3.1 - Espectrofotômetro de absorção atômica de chama.

### 3.2.1 INTERFERÊNCIAS

Os tipos de interferências são de enorme relevância para o sucesso de um método analítico, as determinações quantitativas só se podem fazer por comparação com padrões, pelo que qualquer comportamento da amostra que seja diferente das soluções de referência pode induzir a interferências. Estas são inevitáveis e podem ser de vários tipos: interferências químicas, de ionização, físicas, de fundo e espectrais (Ribeiro, 2006).

No que respeita a interferências espectrais, a complexidade do espectro de emissão propicia o aparecimento deste tipo de interferências produzindo deste modo falsos valores de concentração das espécies em análise. Há momentos em que se observam bandas de emissão provenientes de espécies moleculares gasosas em determinadas regiões do espectro, que podem ser atribuídas a espécies como: H, O, N<sub>2</sub>, etc. O alargamento de riscas espectrais de elementos que se encontram nas amostras em concentração muito elevada dá origem a essas bandas de emissão. Durante a análise poderá ocorrer a sobreposição total ou parcial de riscas referentes a elementos diferentes (Ribeiro, 2006).

As interferências químicas são mais comuns que as espectrais, e são produzidas pela formação de qualquer composto que evita, pelo menos parcialmente, a atomização de um dado elemento. Os efeitos das interferências químicas podem ser minimizados por uma escolha acertada das condições de operação (Gonçalves, 2001).

Ao comparar diferentes amostras aspiradas para uma chama, pode haver uma variação do número total de átomos livres por unidade de volume devido à formação de compostos químicos. Temos que estabelecer uma solução de referência, em relação à qual se mede a variação dos átomos livres, que dum modo geral é uma solução aquosa neutra, ou parcialmente ácida, do metal puro, ou de um sal (exemplo: cloreto ou nitrato). Deste modo podem dar-se desvios positivos ou negativos (Ribeiro, 2006).

As duas principais razões para as interferências químicas são as seguintes: a conversão da amostra em átomos não ser quantitativa, devido às grandes dificuldades em fundir e vaporizar o sal e às moléculas não serem completamente dissociadas, ou os átomos livres reagirem espontaneamente com outros átomos, ou radicais próximos, pelo que não ficam disponíveis para a absorção, o que depende da estequiometria da chama e da afinidade dos átomos para outros existentes na chama (Gonçalves, 2001).

As interferências químicas na chama são principalmente provocadas pela formação de óxidos e hidróxidos, ou ocasionalmente por carburetos e nitrilos, e fazem com que não se possam determinar cerca de trinta elementos ou mais numa chama ar/acetileno, como o alumínio, boro, e que se determinem o elemento boro com sensibilidade baixa, mesmo em chamas quentes e redutoras como é o caso do óxido nitroso/acetileno (Gonçalves, 2001).

### **3.2.2 VANTAGENS E DESVANTAGENS**

Uma análise mais pormenorizada mostra-nos que as vantagens são mais relevantes que as desvantagens em FAAS. Este é um método relativo, pelo que dá valores relativos e não absolutos a um conjunto de padrões de composição conhecida, as características dos padrões são fundamentais (Ribeiro, 2006).

Este método analítico é muito rápido. Após 1966, apareceu o primeiro aparelho automático de absorção atômica em que todos os passos eram executados automaticamente e os resultados impressos diretamente em medidas de concentração. No entanto uma grande desvantagem do método, que por sua vez dificulta a automação é o tempo relativamente grande para se mudar de um elemento para o outro. Com efeito, mudar a lâmpada, ajustar um novo comprimento de onda e outros parâmetros instrumentais como a amplificação, etc., são operações muito morosas, difíceis de automatizar e mecanizar. Sendo assim, é possível fazer a automação para a análise de um só elemento, para um grande número de amostras, mas se, pelo contrário, se tiver que determinar muitos elementos em poucas amostras não é possível fazer a automação com aparelhos comerciais (Gonçalves, 2001; Zhong *et al.*, 2016 ).

É uma técnica analítica bastante útil na determinação de metais em concentrações vestigiais devido à sua elevada especificidade. Contudo, apresenta limitações na detecção, muitas vezes devido à presença de sólidos dissolvidos (Carasek, 2000).



#### **4. VALIDAÇÃO E CONTROLO DA QUALIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

Validação de um método de análise define-se como sendo a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos (NP, 2000).

A especificação dos requisitos, a determinação das características do método e uma verificação de que os requisitos podem ser satisfeitos utilizando o método em causa, também estão incluídos na validação do método. À medida que o desenvolvimento do método se processa, convém que sejam feitas revisões periódicas, a fim de verificar se as condições continuam a ser satisfeitas. A validação é sempre um equilíbrio entre os custos, os riscos e as possibilidades técnicas (NP, 2000).

O grau de confiança nos resultados fornecidos pelo método analítico é expresso em termos de probabilidade estatística, a qual é definida durante o processo de validação. Este processo conduz a critérios de aceitação/rejeição dos resultados obtidos (Wells, 1998)

Portanto, tem de se comprovar, através do fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. Assim, os requisitos para a validação de métodos de análise dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros (DOQ-CGCRE, 2002).

##### **4.1 PARÂMETROS ESTUDADOS NO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

###### **4.1.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO**

Entende-se por calibração, um conjunto de operações estabelecidas, sob condições específicas, que relaciona a resposta de um sistema de medida ou os valores indicados pela medição do instrumento, ou os valores representados pelo material de medida com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida (Lab/G01, 2000).

Quando se faz uma calibração devem ter-se em conta alguns aspetos. Deve-se preparar uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro é conhecida; as condições em que as soluções padrão de calibração são medidas no espectrofotómetro de absorção atômica, têm de ser as mesmas das amostras a analisar; estabelecer um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração da amostra) e por fim determinar a concentração do parâmetro nas amostras (Relacre, 2000).

A equação da reta é dada por:

$$y = a + bx$$

Onde, y é a absorvância; a ordenada na origem; b é o declive da reta de calibração e x é a concentração.

Para avaliar a calibração analítica, pode usar-se o cálculo do coeficiente de correlação (r);

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[ \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$$

Geralmente, as curvas de calibração devem ter valores de coeficientes de correlação superiores a 0,9950 (Relacre, 2000).

#### **4.1.2 GAMA DE TRABALHO**

O primeiro passo a efetuar em cada calibração é a escolha de uma gama de trabalho preliminar. A gama de trabalho deve cobrir uma gama aplicável para as amostras a analisar. Contudo, espera-se frequentemente que a concentração das amostras seja lida no centro da gama de trabalho (Relacre, 2000).

O limite mais baixo da gama de trabalho deve ser igual ou superior ao limite de quantificação do método e o limite mais alto será o valor até ao qual a gama de trabalho tenha homogeneidade de variâncias e linearidade (ISO, 1990).

Assim, a gama de trabalho depende da variância do valor medido, que deve ser independente da concentração onde esta independência é verificada por um teste estatístico: a homogeneidade de variâncias (ISO, 1990).

#### **4.1.3 TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS**

Para verificar a homogeneidade de variâncias são determinadas dez réplicas independentes do primeiro e do último padrão ( $x_1$  e  $x_{10}$ ) da gama de trabalho, e por conseguinte obtêm-se dez valores de absorvância ( $y_{i,j}$ ) para cada série de medições (Relacre, 2000).

Inicialmente, determinam-se as variâncias  $S_1^2$  e  $S_2^2$ , utilizando as absorvâncias das concentrações  $x_1$  e  $x_{10}$ , pelas seguintes equações (ISO, 1990):

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}; \quad \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Em que  $i$  é o número do padrão (neste caso  $i$  vai de 1 a 10) e  $j$  é o número de repetições efetuadas para cada padrão (Relacre, 2000).

As variâncias são testadas pelo Teste-F para examinar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

De seguida compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F (Fischer), para  $n-1$  (graus de liberdade) a um nível de confiança de 99% (Relacre, 2000).

Se  $PG \leq F_{f1; f2; 0,99}$  então as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada; se  $PG > F_{f1; f2; 0,99}$  então diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença de variâncias relativas ao primeiro e ao último padrão permitam obter  $PG \leq F$  (ISO, 1990, Miller & Miller, 2005).

Caso se verifique este último ponto, ou seja, se as diferença entre as variâncias é significativa, terá de se diminuir a gama de trabalho preliminar, de maneira a obter  $PG \leq F$  (ISO, 1990).

#### 4.1.4 LINEARIDADE

Quando um método analítico produz resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra analisada, numa dada gama de trabalho, diz-se que há linearidade do método (DOQ-CGCRE, 2002).

Para avaliar a linearidade de um método pode recorrer-se a uma representação gráfica dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação (ter em atenção este teste de linearidade, pois os coeficientes de correlação não são necessariamente bons indicadores de linearidade), como também pode ser verificada por

cálculos a partir da equação da regressão linear que é determinada pelo método dos mínimos quadrados (Relacre, 2000).

De acordo com a norma ISO 8466/1, a linearidade pode ser verificada através de um modelo estatístico. Inicialmente calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, para obter os respetivos desvios padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$  (ISO, 1990).

A diferença de variâncias ( $DS^2$ ) é calculada pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y^2}^2$$

Em que N é o número total de padrões de calibração.

O  $DS^2$  e as variâncias da função de calibração não linear são testadas pelo Teste-F para examinar se existem diferenças significativas efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

De seguida compara-se este valor de PG com valor tabelado da distribuição F (Fischer), para 1 grau de liberdade para  $DS^2$ , n-3 graus de liberdade para o desvio padrão residual da função de calibração não linear, e a um nível de confiança de 99%. Se  $PG \leq F$  então a função de calibração é linear; se  $PG > F$  então a função de calibração não é linear, portanto, deve avaliar-se a possibilidade de reduzir a gama de trabalho tanto quanto necessário, até que a função de calibração seja linear (ISO, 1990).

#### 4.1.5 LIMITE DE DETEÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de deteção (LD) de um método corresponde ao teor (concentração) mínimo de um analito que se pode detetar com uma certeza estatística razoável. Isto é, o LD corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o nível do branco da amostra, e como tal indicar se o analito em questão se encontra presente ou não (Relacre, 2000).

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que não existe analito a medir, apenas se pode afirmar que a concentração do componente em causa é inferior a um dado valor. Em relação à gama entre o LD e o LQ, pode entender-se que é uma zona de deteção qualitativa e não



quantitativa, por conseguinte não se devem reportar valores nesta gama. O limite de detecção deve ser inferior a 1/10 da concentração da amostra analisada (Lab/G01, 2000).

O limite de quantificação (LQ) corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com um nível aceitável de exatidão e precisão. Isto é o LQ corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal é reduzido a valores razoáveis para que se possa efetuar uma deteção quantitativa (Lab/G01, 2000).

Assim, na gama baixa, o primeiro padrão de calibração deve ser igual ou superior ao limite de quantificação (ISO, 1990).

O limite de quantificação é sempre maior do que o limite de deteção. Atendendo as recomendações da IUPAC, o valor do limite de deteção situa-se acima do sinal médio do branco ( $X_0$ ), a cerca de 3 vezes o desvio padrão do branco, enquanto que o limite de quantificação situa-se a dez vezes o referido desvio padrão (Lab/G01, 2000).

Para o cálculo dos referidos limites, podem ser usados dois métodos (Lab/G01, 2000):

- 1) A partir de uma série de ensaios ( $n > 30$ ) de brancos ou padrões preparados de uma forma independente e lidos em dias diferentes, reproduzindo tanto quanto possível as condições de rotina; calculando por fim a respetiva média e desvio padrão.
- 2) A partir da estatística dos mínimos da reta de calibração admitindo-se que o desvio padrão da estimativa representa o desvio padrão do branco, e interpolando o correspondente valor em concentração obtêm-se as seguintes equações:

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b}$$

Em que:

3,3 – Valor de K, que é um fator numérico para um nível de confiança de 99,7%;

$S(y/x)$  – Desvio padrão residual da curva de calibração;

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N - 2}}$$

$x_i$  – Valores de x (concentração dos padrões utilizados);

$y_i$  – Valores de y (sinal instrumental);

a – Ordenada na origem da curva de calibração;

b – Declive da curva de calibração;

N – Número de padrões utilizados

#### 4.1.6 PRECISÃO

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostra semelhantes ou padrões, em condições definidas, ou seja, a precisão mede a concordância entre os valores obtidos do mesmo método de ensaio, várias vezes em condições definidas. Para avaliar esta dispersão, existem duas determinações designadas por repetibilidade e reprodutibilidade (Relacre, 2000, Taverniers *et al.*, 2004).

##### 4.1.6.1 REPETIBILIDADE

É a precisão, usualmente expressa pelo desvio padrão, de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, em que os ensaios efetuados são sobre uma mesma amostra. Tais condições são: mesmo laboratório; mesmo analista; mesmo equipamento; mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo (Relacre, 2000, González & Herrador, 2007).

Para determinar a repetibilidade de um método num laboratório (também pode ser determinada através de um EIL), efetuam-se uma série de medições ( $n \geq 10$ ) sobre uma mesma amostra ou padrões em vários níveis de concentração, nas condições acima referidas. Por conseguinte, será calculado o desvio padrão para cada nível de concentração, obtendo-se assim o desvio padrão de repetibilidade ( $S_{ri}$ ) associado aos resultados considerados (Relacre, 2000, Taverniers *et al.*, 2004).

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios em condições de repetibilidade é calculado o limite de repetibilidade ( $r$ ), que é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre determinações sucessivas, permitindo ao analista decidir se esta diferença entre duplicados é significativa (DOQ-CGCRE, 2002).

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade ( $r$ ) é avaliado por (Relacre, 2000):

$$r = 2,8 \times S_{ri}$$

Onde, a variância associada à repetibilidade ( $S_{ri}^2$ ) é dado pela equação a partir da qual se calcula o desvio padrão de repetibilidade ( $S_{ri}$ ):

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{w=1} - 1)}$$

Onde ( $S^2_{wi}$ ) é a variância associada aos resultados e ( $n_{wi}-1$ ) são os graus de liberdade da série de análises. O índice  $p$  é referente ao número de laboratórios participantes (caso se determina a repetibilidade através de um EIL,  $p \neq 1$ ).

O coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ), para cada nível de concentração (DOQ-CGCRE, 2002), é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{X}} \times 100$$

Sendo, ( $S_{ri}$ ) o desvio padrão de repetibilidade, para cada nível  $i$  de concentração e  $\bar{X}$  a média dos valores considerados.

#### 4.1.6.2 REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade mede o grau de variabilidade dos valores numéricos encontrados para a mesma amostra, no decurso de vários ensaios realizados em condições diferentes, como por exemplo: dias diferentes (Relacre, 2000, Taverniers *et al.*, 2004).

É quantitativamente avaliada através do desvio padrão associado à média de um conjunto de ensaios independentes, sendo expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou relative standard deviation (RSD):

$$DPR = RSD = (S / \bar{X}) \times 100 \%$$

Onde  $\bar{X}$  é o valor médio do conjunto de resultados e  $S$  é o desvio padrão associado (Relacre, 2000).

Trata-se de um parâmetro estatístico que quantifica a incidência de erros acidentais ou aleatórios num dado resultado analítico. Estes erros ocorrem de acordo com as leis do acaso e são responsáveis pelo aparecimento de uma dispersão de valores isolados em torno do valor médio respetivo. A reprodutibilidade de um método será tanto melhor quanto menor for o valor do desvio padrão relativo, uma vez que a dispersão dos resultados em torno do valor médio é mais reduzida (Relacre, 2000).

O critério de aceitação estabelecido para este parâmetro foi DPR inferior ou igual a 10% tanto para padrões de calibração como para as amostras.

#### 4.1.6.3 PRECISÃO INTERMÉDIA

É a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas tem de definir-se exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas; diferentes equipamentos ou diferentes alturas no tempo. São efetuadas  $n$  medições em replicados, duplicados ou em ensaio único sob as condições pré-definidas, para que a precisão intermédia seja determinada (Relacre, 2000, Taverniers *et al.*, 2004).

#### 4.1.7 EXATIDÃO

A exatidão mede o afastamento do valor medido ao valor verdadeiro. Pode ser avaliada através de ensaios interlaboratoriais, uso de materiais de referência certificados, por testes comparativos e realização de ensaios de recuperação (DOQ-CGCRE, 2002; Taverniers *et al.*, 2004).

##### 4.1.7.1 ENSAIOS INTERLABORATORIAIS

Os EIL consistem num ensaio cego de uma mesma amostra por diversos laboratórios, com o fim de comparar os resultados. Existem vários tipos de EIL, consoante os objetivos a que se destinam. No entanto, para validar um método de ensaio, terá mais interesse recorrer a um EIL de Aptidão, que se destina a avaliar o desempenho do laboratório, como também evidenciar a exatidão dos resultados de um determinado método de ensaio. O resultado do EIL é avaliado através do seguinte parâmetro (z-score) (Relacre, 2000, Taverniers *et al.*, 2004).

$$Z = \left| \frac{X_{\text{lab}} - \bar{X}}{S} \right|$$

Sendo,  $X_{\text{lab}}$  o valor obtido pelo laboratório;  $\bar{X}$  o valor aceite como verdadeiro e  $S$  uma medida dos erros admissíveis.

Os critérios de aceitação ou rejeição do resultado obtido, são os seguintes: se  $Z$  for inferior a 2 considera-se o resultado aceitável, se o  $Z$  estiver compreendido entre 2 e 3 considera-se questionável, e se o  $Z$  for superior a 3 o resultado é insatisfatório e deve ser investigado (Relacre, 2000, González & Herrador, 2007).

Sob ponto de vista da exatidão, alguns laboratórios são melhores do que outros, quer porque conseguem contrariar de maneira eficaz os seus erros sistemáticos, quer ainda porque os seus erros

aleatórios são diminutos e, portanto, a dispersão dos resultados que se obtêm é mais reduzida. Sendo assim, existe uma evidente vantagem na comparação entre laboratórios (Relacre, 2000, Miller & Miller, 2005).

#### 4.1.7.2 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

Sempre que possível devem ser usados MRC's no processo de validação de um método de ensaio. Estes possuem um valor de concentração para cada parâmetro e uma incerteza associada. A exatidão da análise (como também o erro) é determinada pela comparação do valor obtido na análise de um MRC com o valor certificado (DOQ-CGCRE, 2002; Taverniers *et al.*, 2004).

#### 4.1.7.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Os ensaios de recuperação servem de medida da exatidão, em que se adiciona uma quantidade conhecida de padrão à amostra e verifica-se a capacidade do método em recuperar essa quantidade, que pode variar de 80% a 120%. O ensaio de recuperação calcula-se através da seguinte equação (DOQ-CGCRE, 2002):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C(\text{amostra} + \text{padrão}) - C_{\text{amostra}}}{C_{\text{padrão}}} \times 100\%$$

As amostras podem ser adicionadas com o analito (Ni) em pelo menos três diferentes concentrações, próximo do limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível, ou concentração próxima à média da faixa de uso do método.

### 4.2 CONTROLO DA QUALIDADE INTERNO

#### 4.2.1 ENSAIO EM BRANCO

A avaliação das contaminações provenientes de reagentes, reagentes com etapa de digestão e contaminações de campo deverá ser realizada através da análise de ensaios em branco.

A análise de ensaios em branco para a avaliação das contaminações provenientes de reagentes deve ser realizada com os reagentes do mesmo lote dos utilizados na preparação e análise da amostra. De notar, que por cada lote de reagentes deverá ser preparado um ensaio em branco.

No caso de Espectrofotometria de Absorção Atômica de Chama, o valor do próprio branco deverá estar dentro dos limites de aceitação das Cartas de Controlo ou  $A < 0,01$  unidades de absorvância. Se o requisito não se verificar rejeitar o lote de reagentes (Relacre, 2000).

#### **4.2.2 ENSAIOS EM DUPLICADO**

Entende-se por precisão como “Concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas”. Assim sendo, a análise dos ensaios em duplicado das amostras é a precisão do método. O critério de aceitação de duplicados deve ter um erro relativo à média inferior a 10% (Relacre, 2000).

#### **4.2.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO**

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo.

No entanto existe uma limitação do procedimento, pois o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detetável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS**

Para o desenvolvimento e execução deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos, material de vidro comum num laboratório de química; tubos de ensaio de plástico; cadinhos de porcelana; macropipeta e micropipeta calibradas da marca Transferpette; espectrofotômetro de Absorção Atômica por chama marca Agilent Technologies, modelo AAnalyst 240; lâmpada de cátodo de níquel, marca Varian; balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo MS204S; sistema de purificação de água Tipo 1, marca Merck; placa de aquecimento, marca Tristar; mufla, marca Nabertherm.

Todos o material de vidro utilizado foi descontaminado em banho de ácido nítrico (Sigma-Aldrich) 5% (v/v) por um período de 24 h, lavados várias vezes com água desionizada e secos à temperatura ambiente.

### **5.2 REAGENTES E SOLUÇÕES**

Os reagentes utilizados foram ácido nítrico 65 %, marca Sigma-Aldrich; ácido clorídrico 37 %, marca Fluka; soluções padrão 1000 mg L<sup>-1</sup> de Níquel, marca PanReac de lotes diferentes; solução diluída de HCl a 5% (Branco).

### **5.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DE CONTROLO**

A partir da solução padrão comercial de 1000 mg/L, pipetar para um balão de 500 mL o volume de 500 µL para se obter a solução padrão de controlo de níquel de 1,00 ppm, e pipetar 50 µL para um balão de 500 mL para se obter a solução padrão de controlo de níquel de 0,100 ppm. Perfazer com uma solução de HCl (5%) e conservar em frascos de polietileno.

### **5.4 AMOSTRAS**

#### **5.4.1 AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Para a validação do método utilizaram-se duas matrizes, cereais e hortofrutícolas na qual se usou farinha de trigo para representar os cereais, e alface para as hortofrutícolas.

#### **5.4.2 AMOSTRAS ANALISADAS SEGUNDO O MÉTODO VALIDADO**

Após a validação do método de determinação de Ni em alimentos por absorção atômica de chama, foram analisadas amostras compradas num hipermercado local. As amostras analisadas foram farinha de milho, farinha de trigo, arroz, pimento, abóbora, tomate e tomate cherry.

#### **5.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Pesou-se cerca de 5 g de amostra com uma precisão de 0,001 g da amostra homogeneizada num cadinho lavado e descontaminado. Na preparação dos ensaios de recuperação, adicionou-se ao cadinho 7,50 mL da solução padrão de controlo de 1,000 ppm.

Aquecer os cadinhos numa placa de aquecimento até à carbonização da amostra (cerca de 20 min) e depois de carbonizada, colocar na mufla a 550 °C no final do dia. Tirar os cadinhos após 6 h, aproximadamente.

Deixar arrefecer e humedecer com algumas gotas de uma solução de HCl (5%); Se a amostra continuar a ter carbono (partículas cinzentas), colocar na placa para evaporar o ácido e voltar a colocar na mufla.

Dissolver o resíduo com mais alguns mL de uma solução de HCl (5%) e transferir com ajuda de um funil, a solução para um balão volumétrico de 50 mL e perfazer com uma solução de HCl (5%).



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação dizem respeito a dados de validação obtidos para o método de análise de espectrofotometria de absorção atômica por chama para o elemento níquel.

### 6.1 LINEARIDADE

Para a avaliação da linearidade pode recorrer-se à visualização gráfica acompanhada pelo cálculo do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), o qual é um bom indicador da correlação de uma calibração analítica.

Foi selecionado o comprimento de onda 232 nm e foi criada a curva de calibração através da solução padrão de níquel a 1,00 ppm. Obtiveram-se os valores da Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Valores da curva de calibração.

Concentração (x)	Abs (y)	y/x	Média (y/x)
0,000	0,0003		
0,100	0,0060	0,060	10,0
0,200	0,0135	0,068	5,00
0,400	0,0267	0,067	2,50
0,600	0,0391	0,065	1,67
0,800	0,0498	0,062	1,25
1,00	0,0607	0,061	1,00

A partir dos valores da tabela 6.1 obteve-se a curva de calibração como se pode verificar na Figura 6.1.

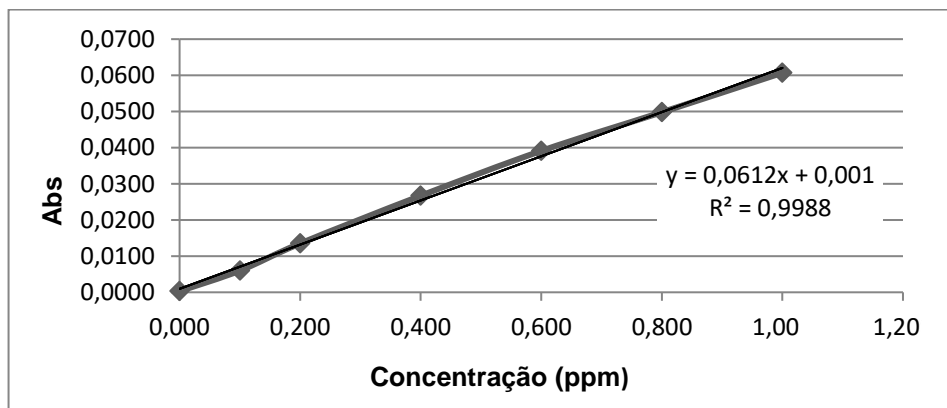


Figura 6.1 – Curva de calibração para o níquel.

A reta apresenta um coeficiente de correlação de 0,9988, o qual é aceitável, sendo que, o critério aplicado para que uma calibração analítica seja satisfatória, deve obedecer à seguinte condição:  $r > 0,9950$ .

Através da avaliação gráfica e do coeficiente de correlação, conclui-se que todas as curvas de calibração são lineares.

## 6.2 REGISTO DE BRANCOS E LIMIARES ANALÍTICOS

Em todas as leituras, no espectrofotômetro de absorção atômica por chama, após a criação da curva de calibração desse dia, determinou-se a concentração do Branco e os valores obtidos encontram-se na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Registo dos brancos nos diferentes dias de análise.

Nº	Data	Concentração (mg/L)	Absorvância
1	23-03-2017	-0,020	-0,002
2	28-04-2017	0,010	0,001
3	11-05-2017	0,000	0,001
4	12-05-2017	-0,010	-0,001
5	25-05-2017	-0,020	-0,002
6	26-05-2017	0,000	-0,000
7	29-05-2017	0,010	0,001
8	30-05-2017	0,000	0,001
9	31-05-2017	0,000	-0,001
10	13-07-2017	0,010	0,001
11	13-07-2017	0,004	0,000
12	13-07-2017	-0,009	-0,001
Média (X)		-0,002	0,000
Desvio Padrão (S)		0,011	0,001
LD ( $X+3,3 \times S$ )		0,033	0,004
LQ ( $X+10 \times S$ )		0,105	0,011

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) deste parâmetro foram calculados com base no desvio padrão da absorvância dos brancos obtidos em condições de precisão intermédia (neste caso: datas diferentes). Como não foi possível realizar mais de 30 ensaios de brancos não se pode garantir que o LD e LQ calculados sejam corretos.

Assim, a determinação destes limiares analíticos foi feita através do método dos mínimos quadrados pela aplicação das equações seguintes e os valores encontram-se na Tabela 6.3.

$$LD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad LQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Tabela 6.3 – Limites de Detecção e Quantificação para as retas estudadas por emissão de chama.

$S_{y/x}$	b	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
0,001	0,058	0,035	0,107

Na determinação do LD e do LQ obteve-se valores de 0,035 mg/L e de 0,107 mg/L, respetivamente. Desta forma, a quantidade mais baixa de níquel numa amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada, é de 0,035 mg/L e a menor concentração de níquel que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão, é de 0,107 mg/L.

### 6.3 TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS

Para a verificação da homogeneidade de variâncias na gama de trabalho, foram realizadas 12 determinações dos padrões extremos da gama de trabalho (Tabela 6.4). Calculou-se a razão das variâncias e comparou-se com o valor tabelado pela distribuição de SNEDCOR para um alfa=0,5%.

Tabela 6.4 – Teste de homogeneidade de variâncias no dia 30 de maio de 2017.

Concentração teórica (mg/L)	Resultados obtidos		Concentração teórica (mg/L)	Concentração teórica	
	xb	Desvio %		xb	Desvio %
0,100	0,103	3,00	1,00	1,00	0,10
	0,097	3,00		1,01	1,50
	0,105	5,00		1,00	0,50
	0,102	2,00		1,04	4,40
	0,104	4,00		1,02	1,90
	0,098	2,00		1,01	1,00
	0,105	5,00		1,04	3,90
	0,100	0,00		1,00	0,30
	0,102	2,00		1,04	3,60
	0,104	4,00		1,01	0,80
	0,102	2,00		1,06	6,20
	0,100	0,00		1,02	2,40
Valor médio	0,102		Valor médio	1,02	
Desvio padrão	0,026		Desvio padrão	0,02	
Variância	0,000663		Variância	0,000353	
Desvio Relativo Médio %	2,7		Desvio Relativo Médio %	2,2	

As variâncias são testadas para examinar se existem diferenças significativas nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor teste PG. O PG ( $S^2_{\text{maior}}/S^2_{\text{menor}}$ ) é igual a 0,53 e compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F que é igual 3,18.

Como PG é inferior ao PG tabelado, conclui-se que existe homogeneidade de variâncias nos extremos da gama de trabalho.

## 6.4 CONTROLO DA SENSIBILIDADE

A sensibilidade de um método permite avaliar a capacidade deste para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analíto. É dada pela variação do sinal instrumental causada por uma pequena variação da concentração de analíto.

A sensibilidade é assim representada pelo declive da curva de calibração. A Tabela 6.5 mostra os resultados obtidos para a sensibilidade do método aplicado ao elemento níquel por absorção atômica de chama.

Tabela 6.5 – Análise da sensibilidade para o Ni, para um nível de confiança de 95%.

Nº	Data	r <sup>2</sup>	Declive	Média (x)	x+2s	x-2s
1	23-03-2017	0,9995	0,0684	0,059	0,071	0,047
2	28-04-2017	0,9998	0,0639			
3	11-05-2017	1,0000	0,0508			
4	12-05-2017	0,9995	0,0564			
5	25-05-2017	0,9990	0,0553			
6	26-05-2017	0,9989	0,0569			
7	29-05-2017	0,9989	0,0627			
8	30-05-2017	0,9998	0,0547			
9	31-05-2017	0,9995	0,0511			
10	13-07-2017	0,9977	0,0556			
11	13-07-2017	0,9982	0,0689			
12	13-07-2017	0,9985	0,0624			

Apoiando-se este estudo em curvas de calibração, tem-se que a sensibilidade associada ao método é dada pelo declive das mesmas, pelo que esta aumenta com o aumento do declive. Portanto a sensibilidade para a determinação do níquel é de  $0,059 \pm 0,012$ .

No gráfico da Figura 6.2 encontram-se os declives obtidos dos ensaios realizados.

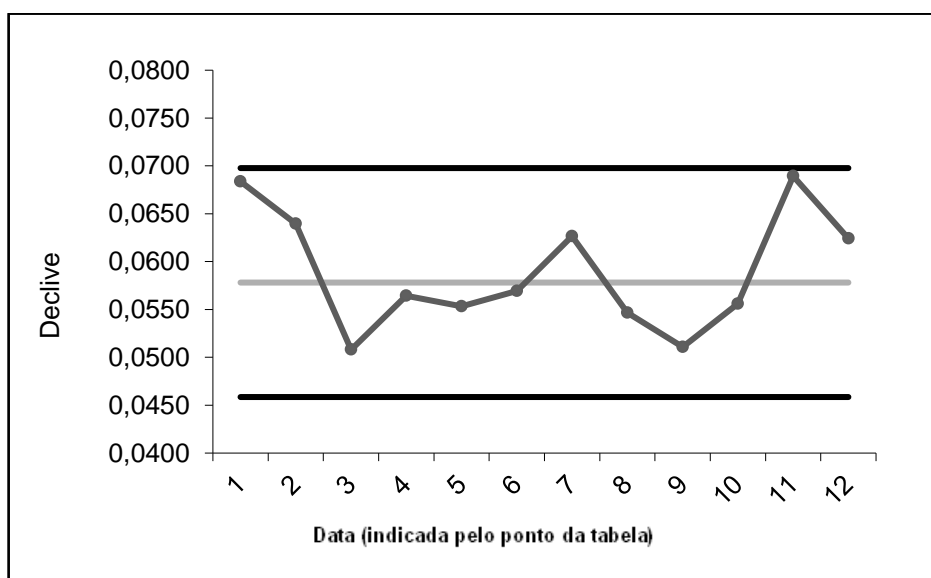


Figura 6.2 – Carta de controle das curvas de calibração.

## 6.5 PADRÕES DE CONTROLO

Em todos os dias de análise, houve o controlo dos padrões de 0,100 mg/L e 1,00 mg/L de forma a comprovar que o método de determinação do níquel estava a quantificar as concentrações já conhecidas. Na Tabela 6.6 e 6.7 encontram-se os valores obtidos do padrão de controlo de 0,100 mg/L e de 1,00 mg/L, respetivamente.

Tabela 6.6 – Controlo do padrão de 0,100 mg/L.

Nº	Data	Resultado (mg/L)	Erro relativo (%)	Média (mg/L)	S (mg/L)	CV (%)	Erro relativo médio (%)
1	23-03-2017	0,090	9,09	0,099	0,007	6,7	5,6
2	28-04-2017	0,090	9,09				
3	11-05-2017	0,100	1,01				
4	12-05-2017	0,100	1,01				
5	25-05-2017	0,090	9,09				
6	26-05-2017	0,100	1,01				
7	29-05-2017	0,110	11,11				
8	30-05-2017	0,094	5,05				
9	31-05-2017	0,091	8,08				
10	13-07-2017	0,103	4,04				
11	13-07-2017	0,097	2,02				
12	13-07-2017	0,105	6,06				

Tabela 6.7 – Controlo do padrão de 1,00 mg/L.

Nº	Data	Resultado (mg/L)	Erro relativo (%)	Média (mg/L)	S (mg/L)	CV (%)	Erro relativo médio (%)
1	23-03-2017	1,05	4,09	1,01	0,04	3,8	3,2
2	28-04-2017	1,06	5,09				
3	11-05-2017	1,03	2,11				
4	12-05-2017	1,00	0,86				
5	25-05-2017	0,980	2,85				
6	26-05-2017	0,960	4,83				
7	29-05-2017	1,03	2,11				
8	30-05-2017	1,00	0,82				
9	31-05-2017	0,993	1,56				
10	13-07-2017	0,975	3,34				
11	13-07-2017	0,957	5,13				
12	13-07-2017	1,07	5,98				

Por análise dos dados da tabela, pode-se concluir que as condições estudadas permitem obter bons resultados, conseguindo um erro relativo abaixo dos 10%, bem como o valor do CV, cumprindo assim com os critérios de aceitação. É de salientar que a precisão do método é maior no padrão de 0,100 ppm.

Na Figura 6.3 e 6.4 estão representadas graficamente a Carta de Controlo de qualidade do padrão controlo de 0,100 mg/L e de 1,000 mg/L, respetivamente.

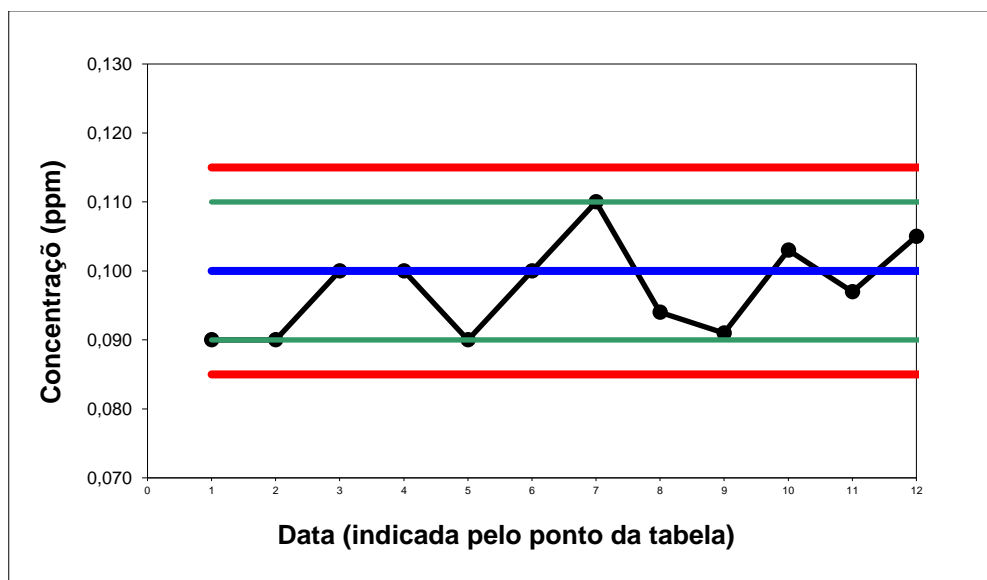


Figura 4.3 – Representação gráfica do controlo do padrão de 0,100 mg/L para o níquel. As linhas vermelhas representam o intervalo da média  $\pm 3$  x desvio padrão. As linhas verdes representam o intervalo da média  $\pm 2$  x desvio padrão.

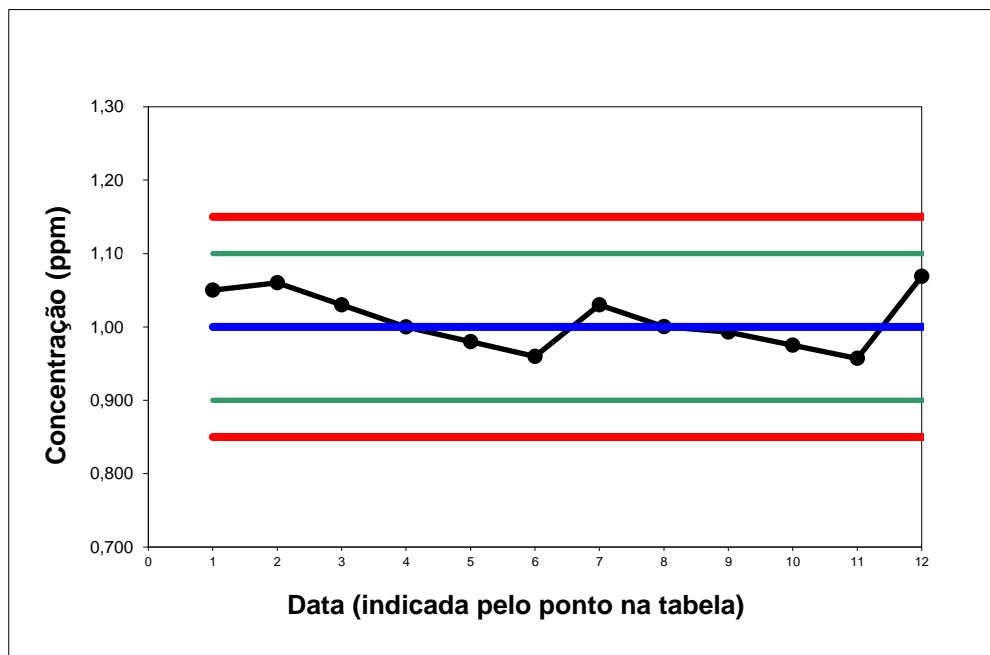


Figura 6.4 – Representação gráfica do controlo do padrão de 1,00 mg/L para o níquel. As linhas vermelhas representam o intervalo da média  $\pm 3$  x desvio padrão. As linhas verdes representam o intervalo da média  $\pm 2$  x desvio padrão.

Através das Figuras 6.3 e 6.4, verifica-se que os valores medidos, em ambas as concentrações de controlo, não ultrapassam os limites tracejados a verde, cumprindo assim com os critérios de aceitação.

## 6.6 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Na Tabela 6.8 encontram-se os valores de percentagem de recuperação das amostras analisadas para o níquel em vários dias diferentes e em diferentes matrizes. Estes valores de recuperação baseiam-se na divisão do valor da concentração obtida no ensaio pelo valor teórico adicionado que é 0,150 mg/L. O critério de aceitação especifica que o limite de recuperação deve ser entre 80 a 120%.

Tabela 6.8 – Ensaios de recuperação das amostras com Ni.

Data	Amostra	Matriz	Concentração obtida na amostra (mg/L)	Concentração obtida na amostra mais padrão (mg/L)	Recuperação (%)
28-04-2017	Farinha de trigo	Cereal	<LQ	0,175	117
11-05-2017	Farinha de trigo	Cereal	<LQ	0,160	86,7
12-05-2017	Farinha de trigo	Cereal	<LQ	0,125	83,3
29-05-2017	Alface	Hortofrutícola	<LQ	0,154	91,3
30-05-2017	Alface	Hortofrutícola	<LQ	0,165	100
31-05-2017	Alface	Hortofrutícola	<LQ	0,142	85,3

Como se pode verificar pelos valores de recuperação obtidos nas diferentes matrizes alimentares, temos uma gama de valores entre os 83%-117%, portanto todas as amostras analisadas tiveram recuperações aceitáveis.

Pode-se concluir que as condições usadas na digestão das amostras permitiram a obtenção de boas recuperações do níquel, que era o que se pretendia que acontecesse, por forma a poder validar o método em estudo para a quantificação de níquel nos alimentos.

## 6.7 CONTROLO DE DUPLICADOS

De forma a garantir o controlo de qualidade devem fazer-se periodicamente, ensaios em duplicado das amostras fortificadas. No presente estudo as amostras foram fortificadas com 0,150 mg/L de níquel, correspondendo a concentração teórica do níquel de 1,50 mg/kg.

Na tabela 6.9 encontram-se os resultados obtidos dos duplicados em cada dia de análise.



Tabela 6.9 – Controlo dos duplicados das amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni.

Data	Amostra	Matriz	[Rep 1] (mg/kg)	[Rep 2] (mg/kg)	Média	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)
28-04-2017	Farinha de trigo	Cereal	1,74	1,67	1,71	0,070	4,11
11-05-2017	Farinha de trigo	Cereal	1,59	1,57	1,58	0,020	1,27
12-05-2017	Farinha de trigo	Cereal	1,25	1,37	1,31	0,120	9,16
29-05-2017	Alface	Hortofrutícola	1,53	1,45	1,49	0,080	5,37
30-05-2017	Alface	Hortofrutícola	1,65	1,53	1,59	0,120	7,23
31-05-2017	Alface	Hortofrutícola	1,42	1,44	1,43	0,027	1,89

Por análise dos dados da tabela, pode-se concluir que as condições estudadas permitem obter bons resultados, conseguindo uma amplitude relativa abaixo dos 10%, cumprindo assim com os critérios de aceitação.

## 6.8 REPETIBILIDADE

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre a mesma amostra ou padrões em condições tão estáveis quanto possível (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, num curto intervalo de tempo, etc).

A determinação da repetibilidade foi testada efetuando 12 réplicas do ensaio fortificado com 0,150 mg/L de níquel, sendo a concentração teórica de 1,50 mg/kg deste elemento. Para se validar este parâmetro, foram usadas duas matrizes alimentares diferentes como se pode verificar na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 – Análise dos resultados obtidos para o limite de repetibilidade (r) para as matrizes de cereais e hortofrutícolas com amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni.

Cereais		
Data	Amostra	mg/kg
28-04-2017	Farinha Trigo	1,74
		1,67
		1,72
		1,71
		1,65
		1,69
		1,78
		1,60
		1,63
		1,66
		1,77
		1,56
Desvio padrão (S <sub>r</sub> )		0,07
Média		1,68
Nº		12
Repetibilidade (r)		0,19
Repetibilidade (%)		11,1
CV <sub>r</sub> (%)		4,0

Hortofrutícolas		
Data	Amostra	mg/kg
29-05-2017	Alface	1,53
		1,45
		1,51
		1,48
		1,40
		1,42
		1,42
		1,51
		1,41
		1,47
		1,42
		1,41
Desvio padrão (S <sub>r</sub> )		0,05
Média		1,45
Nº		12
Repetibilidade (r)		0,13
Repetibilidade (%)		8,86
CV <sub>r</sub> (%)		3,2

A repetibilidade associada às leituras das amostras foi avaliada, na qual se verifica que o coeficiente de variação é inferior a 10% nas duas matrizes.

## 6.9 PRECISÃO INTERMÉDIA

Este parâmetro é importante no que diz respeito à atividade prática do laboratório, pois alguns fatores de variabilidade não podem facilmente ser testados internamente. A precisão intermédia foi calculada com base no desvio padrão da variância entre replicados ao longo do tempo. Na tabela 6.11 encontram-se os resultados obtidos nas matrizes de cereais e hortofrutícolas fortificadas com 0,150 mg/L de níquel, que corresponde a uma concentração teórica de 1,50 mg/kg de Ni.

Tabela 6.11 – Precisão intermédia para as matrizes de cereais e hortofrutícolas com amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni.

Cereais		
Data	Amostra	mg/kg
11-05-2017	Farinha Trigo	1,59
		1,57
		1,58
		1,55
		1,66
12-05-2017		1,25
		1,37
		1,47
		1,46
		1,31
Desvio padrão		0,13
Média		1,48
Nº		10
Precisão Intermédia		0,38
Precisão Intermédia %		25,4
CV (%)		9,1

Hortofrutícolas		
Data	Amostra	mg/kg
30-05-2017	Alface	1,65
		1,53
		1,53
		1,58
		1,53
31-05-2017		1,42
		1,44
		1,41
		1,52
		1,40
Desvio padrão		0,08
Média		1,50
Nº		10
Precisão Intermédia		0,23
Precisão Intermédia %		15,3
CV (%)		5,4

Para além de considerar a variação no tempo, poder-se-ia ter considerado a variação de operador e de equipamento, e efetuar-se o mesmo processo para as duas matrizes alimentares.

A precisão intermédia deve ser considerada como melhor prática que a repetibilidade pois fornece resultados mais robustos devido aos fatores de variabilidade que lhes são impostos. Como tal, este estudo deve ser feito ao longo de mais tempo, o que não foi o caso nesta validação, foi apenas efetuado durante apenas 1 mês (tempo a partir do qual a gama de trabalho foi validada).

## 6.10 EXATIDÃO

O estudo da exatidão do método foi avaliado de duas formas, a primeira através de testes de recuperação e a segunda através da participação num ensaio interlaboratorial.

Nas Tabelas 6.12 e 6.13 encontram-se os valores obtidos da percentagem de recuperação de 0,150 ppm de Ni nos ensaios em cereais e em hortofrutícolas, respetivamente.

Tabela 6.12 – Ensaio de recuperação com 0,150 ppm de Ni em cereais.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
28-04-2017	Farinha  de trigo	0,150	<LQ	0,175	118
				0,167	111
				0,173	115
				0,172	115
				0,165	110
				0,169	113
				0,178	119
				0,160	107
				0,167	109
				0,166	112
				0,178	119
				0,156	104
			Média	0,169	112
			Desvio Padrão	0,007	5
			CV (%)	4,1	4,1

Tabela 6.13 – Ensaio de recuperação com 0,150 ppm de Ni em hortofrutícolas.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
29-05-2017	Alface	0,150	<LQ	0,155	91,3
				0,145	85,3
				0,151	89,3
				0,148	87,3
				0,140	82,0
				0,142	83,3
				0,142	83,3
				0,151	89,3
				0,141	82,7
				0,147	86,7
				0,142	83,3
				0,141	82,7
			0,005	3,2	
			3,3	3,7	

Em termos de percentagem de recuperação para o níquel, obteve-se valores bastante aceitáveis para ambas matrizes. No caso dos cereais obtiveram-se valores entre os 104%-119%, e nos hortofrutícolas entre obtiveram-se valores entre os 82%-91%.

Provavelmente, os baixos valores de recuperação no caso dos hortofrutícolas foram devidos, a perdas de níquel na etapa de carbonização da amostra na placa de aquecimento. Isto porque o níquel é um composto volátil, e neste caso, a matriz hortofrutícola demorou mais 10 minutos a carbonizar do que a matriz cereal. Contudo, como os valores se encontram entre 80%-120%, então cumprem com o critério de aceitação.

Foi efetuada uma solução padrão intermédia de 10,0 ppm de Ni da qual se adicionou 1,5 mL à amostra para se analisar os ensaios de recuperação de 0,300 ppm de Ni. Por sua vez, para os ensaios de recuperação de 0,600 ppm, adicionaram-se 3 mL da solução padrão intermédia de 10,0 ppm de Ni na amostra para um volume final de 50 mL.

Nas Tabelas 6.14 e 6.15 encontram-se os valores obtidos da percentagem de recuperação de 0,300 ppm de Ni nos ensaios em cereais e em hortofrutícolas, respetivamente, e nas Tabelas 6.16 e 6.17 encontram-se os valores obtidos da percentagem de recuperação de 0,600 ppm de Ni nos ensaios em cereais e em hortofrutícolas, respetivamente.

Tabela 6.14 – Ensaios de recuperação com 0,300 ppm de Ni em cereais.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
13-07-2017	Farinha de trigo	0,300	<LQ	0,303	99,3
				0,283	92,7
				0,305	100
				0,285	93,3
				0,298	97,7
				0,296	97,0
				0,291	95,3
				0,278	91,0
				0,287	94,0
				0,289	94,7
				0,287	94,0
				0,350	115
				<b>Média</b>	97,0
				<b>Desvio Padrão</b>	6,3
				<b>CV (%)</b>	6,5

Tabela 6.15 – Ensaio de recuperação com 0,300 ppm de Ni em hortofrutícolas.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
13-07-2017	Alface	0,300	<LQ	0,290	96,7
				0,291	97,0
				0,281	93,7
				0,280	93,3
				0,286	95,3
				0,279	93,0
				0,289	96,3
				0,289	96,3
				0,286	95,3
				0,294	98,0
				0,292	97,3
				0,291	97,0
			Desvio Padrão	0,005	1,7
			CV (%)	1,7	1,7

Tabela 6.16 – Ensaio de recuperação com 0,600 ppm de Ni em cereais.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
13-07-2017	Farinha de trigo	0,600	<LQ	0,576	95,2
				0,578	95,5
				0,584	96,5
				0,556	91,8
				0,560	92,5
				0,568	93,8
				0,563	93,0
				0,568	93,8
				0,578	95,5
				0,560	92,5
				0,562	92,8
				0,560	92,5
			Desvio Padrão	0,009	1,5
			CV (%)	1,6	1,6

Tabela 6.17 – Ensaios de recuperação com 0,600 ppm de Ni em hortofrutícolas.

Data	Amostra	Concentração teórica (mg/L)	Concentração amostra (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)	Recuperação (%)
13-07-2017	Alface	0,600	<LQ	0,580	96,7
				0,558	93,0
				0,571	95,2
				0,546	91,0
				0,566	94,3
				0,564	94,0
				0,569	94,8
				0,579	96,5
				0,574	95,7
				0,559	93,2
				0,560	93,3
				0,566	94,3
			Desvio Padrão	0,010	1,6
			CV (%)	1,7	1,7

Como se pode verificar nas tabelas anteriores, em todas as fortificações de 0,150 ppm, 0,300 ppm e 0,600 ppm obtiveram-se recuperações entre os 80% e os 120% com os CV sempre abaixo de 10%, cumprindo assim com o critério de aceitação.

Para o ensaio interlaboratorial, uma amostra de puré de vegetais foi analisada pelo Fapas – Food Chemistry, e o resultado foi de 1,51 mg/kg de Ni sendo este o valor de referência. Foi realizado um ensaio em duplicado da mesma amostra de puré de vegetais, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 6.18.

Tabela 6.18 – Ensaio interlaboratorial.

Data	Resultado obtido	Valor Ref <sup>a</sup>	Avaliação (z-score)	Erro Relativo (%)
31-05-2017	1,58	1,51	0,200	4,1
31-05-2017	1,50	1,51	-0,080	1,2

Pelos resultados apresentados pode-se verificar que se conseguiu obter valores muito satisfatórios, visto que os valores de Z-score são inferiores a 2, cumprindo com o critério de aceitação, o que comprova a exatidão do método de determinação de níquel, além de apresentar também valores de concentração muito próximos dos valores de referência.

## 6.11 ANÁLISE DAS AMOSTRAS SEGUNDO O MÉTODO VALIDADO

Segundo o método implementado, e de forma a garantir o controlo de qualidade devem fazer-se ensaios de recuperação e ensaios em duplicado das amostras fortificadas.

Na Tabela 6.19 encontram-se os valores de percentagem de recuperação das amostras compradas num hipermercado local, amostras estas que foram fortificadas com 0,150 mg/L de níquel, correspondendo a concentração teórica do níquel de 1,50 mg/kg.

Tabela 6.19 – Ensaios de recuperação das amostras com Ni.

Data	Amostra	Matriz	Concentração obtida na amostra (mg/L)	Concentração obtida na amostra mais padrão (mg/L)	Recuperação (%)
25-05-2017	Arroz integral	Cereal	<LQ	0,155	93,3
13-07-2017	Farinha de milho	Cereal	<LQ	0,144	94,7
13-07-2017	Farinha de trigo	Cereal	<LQ	0,145	96,7
13-07-2017	Arroz	Cereal	<LQ	0,135	81,3
13-07-2017	Pimento	Hortofrutícola	<LQ	0,131	87,3
13-07-2017	Abóbora	Hortofrutícola	<LQ	0,151	87,3
13-07-2017	Tomate	Hortofrutícola	<LQ	0,148	98,7
13-07-2017	Tomate cherry	Hortofrutícola	<LQ	0,140	88,0

Obtiveram-se bons ensaios de recuperação, uma vez que as percentagens encontram-se dentro do intervalo de 80% e 120%. Além disso, verifica-se que todas as amostras analisadas têm concentrações de Ni inferiores ao LQ, demonstrando que estes produtos estão livres de contaminação de Ni, sendo um aspeto positivo para a nossa saúde.

Na Tabela 6.20 encontram-se o controlo dos duplicados das amostras compradas num hipermercado local fortificadas com Ni.

Tabela 6.20 – Controlo dos duplicados das amostras fortificadas com 0,150 ppm de Ni.

Data	Amostra	Matriz	[Rep 1] (mg/kg)	[Rep 2] (mg/kg)	Média	Amplitude absoluta	Amplitude relativa (%)
25-05-2017	Arroz integral	Cereal	1,55	1,68	1,62	0,130	8,05
13-07-2017	Farinha de milho	Cereal	1,44	1,35	1,40	0,084	6,02
13-07-2017	Farinha de trigo	Cereal	1,45	1,39	1,42	0,056	3,95
13-07-2017	Arroz	Cereal	1,34	1,34	1,34	0,005	0,37
13-07-2017	Pimento	Hortofrutícola	1,29	1,34	1,32	0,052	3,95
13-07-2017	Abóbora	Hortofrutícola	1,51	1,43	1,47	0,082	5,58
13-07-2017	Tomate	Hortofrutícola	1,47	1,49	1,48	0,018	1,21
13-07-2017	Tomate cherry	Hortofrutícola	1,40	1,42	1,41	0,015	1,06



Verifica-se que a amplitude relativa de todas as amostras analisadas é inferior a 10%, por isso, não existe uma variação significativa entre os duplicados, logo o controlo de qualidade é aceite.

O teor de Ni, nas amostras analisadas, foi inferior ao LQ, o mesmo não se verificou noutros estudos. Segundo Idrees e colaboradores, a concentração de Ni em abóbora foi de 1,25 mg/kg, no melão foi de 1,35 mg/kg, na couve branca foi de 4,08 mg/kg, entre outras hortofrutícolas (Idrees *et al.*, 2017).

Quanto à farinha de trigo, o estudo realizado por González e colaboradores mostrou que as concentrações de Ni nas farinhas variaram entre 0,160 e 0,280 mg/kg (González *et al.*, 1999).

Contudo, segundo Poulik, os resultados provaram que a alface tem pouca capacidade de absorção e acumulação de níquel, uma vez que a quantidade de níquel na alface foi muito baixa, cerca de 28,7 µg/kg na amostra com maior contaminação de níquel, sendo inferior ao LQ determinado no método desenvolvido no presente estudo (Poulik, 1999).

Segundo um estudo recente de Cao e colaboradores, os resultados mostraram que a concentração de Ni em arroz moído da China foi cerca de 0,50 mg/kg (Cao *et al.*, 2017). No entanto o método analítico usado por estes investigadores foi por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), o que permite a leitura de LQ's mais baixos que 0,107 ppm determinado no presente estudo. Além disso, a digestão da amostra foi através de tubos de digestão de polipropileno, levando a menores perdas do analito devido à sua volatilidade.



## 7. CONCLUSÕES

Esta tese de mestrado teve como principal objetivo a validação de um método de análise para determinação de níquel nos alimentos por espectrofotometria de absorção atômica de chama, nos laboratórios de química da SGS.

De acordo com os resultados obtidos pode concluir-se o seguinte:

- o método implementado possui um LD 0,035 ppm e um LQ de 0,107 ppm;
- a linearidade foi verificada entre as concentrações 0,100 ppm e 1,00 ppm;
- o teste de homogeneidade de variâncias mostrou que não existem diferenças significativas para as concentrações estudadas;
- em termos de repetibilidade, a metodologia encontra-se validada para cereais e hortofrutícolas, uma vez que o CV foi inferior a 4%;
- a análise da precisão intermédia, na qual se variou o dia de análise, apresentou uma variabilidade dos resultados quer para os cereais quer para os hortofrutícolas, inferior a 10%, o que foi aceite.
- a avaliação da exatidão do método, foi determinada pelos testes de recuperação e um ensaio interlaboratorial. Os testes de recuperação, em ambas as matrizes, foram realizados através da fortificação com três concentrações diferentes de Ni dentro da gama de trabalho. Atendendo a que o critério de aceitação é entre 80% e 120% confirmou-se a exatidão do método e é de salientar que as fortificações com 0,600 ppm de Ni foram as que tiveram menores CV, abaixo dos 2%. Quanto ao ensaio interlaboratorial, o Z-Score foi inferior a 2, portanto, considera-se que o resultado é aceitável.

Os resultados do controlo interno, ensaios em branco e recuperação, foram satisfatórios. A análise de amostras de cereais e hortofrutícolas de um hipermercado, nomeadamente farinha de milho, farinha de trigo, arroz, pimento, abóbora, tomate e tomate cherry, apresentaram valores de Ni inferiores ao LQ.

Como perspetiva futura será importante validar este método de determinação de níquel nos alimentos por espectrofotometria de absorção atômica de chama, num maior número de matrizes como em pescado e carnes, por causa da bioacumulação de metais nos animais.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANKE, M., TRÜPSCHUCH, A. & GUNSTHEIMER, G. 2002. The Biological and Medical Importance of the Interactions between Nickel and Zinc, Magnesium and Manganese in Vivo. *Trace Elements in Man and Animals*, 10, 685-686.
- ASATO, N., VAN SOESTBERGEN, M. & SUNDERMAN, F. W. 1975. Binding of  $^{63}\text{Ni}$  (II) to ultrafiltrable constituents of rabbit serum in vivo and in vitro. *Clinical chemistry*, 21, 521-527.
- AU, A., HA, J., HERNANDEZ, M., POLOTSKY, A., HUNGERFORD, D. S. & FRONDOZA, C. G. 2006. Nickel and vanadium metal ions induce apoptosis of T-lymphocyte Jurkat cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79, 512-521.
- BARCELOUX, D. G. & BARCELOUX, D. 1999. Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37, 239-258.
- BAYRAK, H., DURAN, C. & SOYLAK, M. 2017. Determination of Au (III) and Pd (II) ions by flame atomic absorption spectrometry in some environmental samples after solid phase extraction. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99, 590-600.
- BERG, T., RØYSET, O., STEINNES, E. & VADSET, M. 1995. Atmospheric trace element deposition: principal component analysis of ICP-MS data from moss samples. *Environmental Pollution*, 88, 67-77.
- CAO, Z., MOU, R., CAO, Z., LIN, X., XU, P., CHEN, Z., ZHU, Z. & CHEN, M. 2017. Nickel in milled rice (*Oryza sativa* L.) from the three main rice-producing regions in China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10, 69-77.
- CARASEK, E. 2000. A low-cost flame atomic absorption spectrometry method for determination of trace metals in aqueous samples. *Talanta*, 51, 173-8.
- CARRAPATOSO, I., LOUREIRO, G., LOUREIRO, C., FARIA, E., TODO-BOM, A. & CHIEIRA, C. 2004. Dermite endógena induzida pela ingestão de níquel: a propósito de dois casos clínicos. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, XII, 261-270.
- CEMPEL, M. & NIKEL, G. 2006. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15.
- DE TONI, L., TISATO, F., SERAGLIA, R., ROVERSO, M., GANDIN, V., MARZANO, C., PADRINI, R. & FORESTA, C. 2017. Phthalates and heavy metals as endocrine disruptors in food: A study on pre-packed coffee products. *Toxicology Reports*, 4, 234-239.
- DENKHAUS, E. & SALNIKOW, K. 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42, 35-56.
- DOQ-CGCRE, I. 2002. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. *Rio de Janeiro. Brasil*.
- DUDA-CHODAK, A. & BLASZCZYK, U. 2008. The impact of nickel on human health. *Journal of Elementology*, 13, 685-693.
- FREITAS, M., BARCELLOS-DE-SOUZA, P., BARJA-FIDALGO, C. & FERNANDES, E. 2013. Nickel induces apoptosis in human neutrophils. *Biometals*, 26, 13-21.
- GLENNON, J. D. & SARKAR, B. 1982. Nickel (II) transport in human blood serum. Studies of nickel (II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine. *Biochemical Journal*, 203, 15-23.
- GONÇALVES, M. D. L. S. S. 2001. *Métodos instrumentais para análise de soluções: Análise quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, 1050p.
- GONZÁLEZ, A. G. & HERRADOR, M. Á. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 227-238.
- GONZÁLEZ, M., GALLEGÓ, M. & VALCÁRCEL, M. 1999. Determination of nickel, chromium and cobalt in wheat flour using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 48, 1051-1060.
- IDREES, M., REHMAN, Z., BIBI, S., SHAH, F., GULAB, H., ALI, L. & MABOOD, F. 2017. Multivariate analysis of the heavy metal concentrations in the vegetable and soil samples—a case study from district charsadda and district mardan. *Pak. J. Bot*, 49, 1167-1171.
- ISO 1990. Water quality-calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. *Part*, 1, 8466-1.
- JENSEN, C. S., MENNÉ, T., LISBY, S., KRISTIANSEN, J. & VEIEN, N. K. 2003. Experimental systemic contact dermatitis from nickel: a dose–response study. *Contact Dermatitis*, 49, 124-132.

- KASPRZAK, K. S., SUNDERMAN, F. W. & SALNIKOW, K. 2003. Nickel carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533, 67-97.
- LAB/G01, G. 2000. Guia para acreditação de laboratórios em ensaios químicos. *Instituto Português da Qualidade*, 3ª Edição.
- LI, Y. & ZAMBLE, D. B. 2009. Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chemical Reviews*, 109, 4617-4643.
- LI, Z., PAN, J. & TANG, J. 2002. Determination of nickel in food by spectrophotometry with o-carboxylbenzenediazo-aminoazobenzene. *Analytical Letters*, 35, 167-183.
- LU, H., SHI, X., COSTA, M. & HUANG, C. 2005. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279, 45-67.
- MCGREGOR, D., BAAN, R., PARTENSKY, C., RICE, J. & WILBOURN, J. 2000. Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies—a report of an IARC Monographs Programme Meeting. *European Journal of Cancer*, 36, 307-313.
- MERIAN, E. 1984. Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 8, 9-38.
- MILLER, J. N. & MILLER, J. C. 2005. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education.
- NIELSEN, F. H. 1984. Ultratrace elements in nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 4, 21-41.
- NP 2000. EN ISO/IEC 17025 (2000) Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaio e calibração. *Instituto Português da Qualidade*. 40p.
- PEETERS, K., ZULIANI, T., ŽIGON, D., MILAČIČ, R. & ŠČANČAR, J. 2017. Nickel speciation in cocoa infusions using monolithic chromatography–Post-column ID-ICP-MS and Q-TOF-MS. *Food Chemistry*, 230, 327-335.
- POULIK, Z. 1999. Influence of nickel contaminated soils on lettuce and tomatoes. *Scientia horticulturae*, 81, 243-250.
- RELACRE, G. 2000. Validação de métodos internos de ensaio em análise química. *Lisboa: Relacre*, 13.
- RIBEIRO, C. M. C. D. M. 2006. *Estabelecimento de uma rotina laboratorial para análise química de sedimentos e sua aplicação a sedimentos continentais do Minho (NW Portugal): contribuição para a reconstituição paleoambiental da região*. Mestrado em Ciências do Ambiente. Universidade do Minho.
- SCANLON, S. E., SCANLON, C. D., HEGAN, D. C., SULKOWSKI, P. L. & GLAZER, P. M. 2017. Nickel induces transcriptional down-regulation of DNA repair pathways in tumorigenic and non-tumorigenic lung cells. *Carcinogenesis*, 38, 627-637.
- SCHIFFER, R., SUNDERMAN, F. W., BAGGS, R. B. & MOYNIHAN, J. A. 1991. The effects of exposure to dietary nickel and zinc upon humoral and cellular immunity in SJL mice. *Journal of Neuroimmunology*, 34, 229-239.
- SGS 2017a. Liderança e Inovação desde 1878. *Documento informativo do Grupo SGS*, 8.
- SGS 2017b. Perfil do Grupo. *Documento informativo do Grupo SGS*, 5.
- SGS 2017c. SGS em Portugal. Disponível em: <<http://www.sgs.pt/pt-PT/Our-Company/About-SGS/SGS-in-Brief/SGS-in-Portugal.aspx>>. Acedido em 23 de março de 2017
- SKOOG, D., HOLLER, F. & NIEMAN, T. 2002. *Princípios de Análise Instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 836 p.
- SLAVIN, W. 1992. A comparison of atomic spectroscopic analytical techniques. *Spectroscopy International*, 4, 22-27.
- SPIEWAK, R., PIETOWSKA, J. & CURZYTEK, K. 2007. Nickel: a unique allergen—from molecular structure to European legislation. *Expert Review of Clinical Immunology*, 3, 851-859.
- SUNDERMAN JR, W. 1983. Potential toxicity from nickel contamination of intravenous fluids. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 13, 1-4.
- TAVERNIERS, I., DE LOOSE, M. & VAN BOCKSTAELE, E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, 535-552.
- TORRES, F., DAS GRAÇAS, M., MELO, M. & TOSTI, A. 2009. Management of contact dermatitis due to nickel allergy: an update. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology: CCID*, 2, 39.
- UE, R. 2016. Monitorização do níquel nos alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 183/70.
- VAN LOON, J. C. 1985. *Selected methods of trace metal analysis: biological and environmental samples*, Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, Wiley-Interscience, 357p.

- WELLS, R. J. 1998. Validation requirements for chemical methods in quantitative analysis – horses for courses? *Accreditation and Quality Assurance*, 3, 189-193.
- WITTSIEPE, J., SCHNELL, K., HILBIG, A., SCHREY, P., KERSTING, M. & WILHELM, M. 2009. Dietary intake of nickel and zinc by young children—results from food duplicate portion measurements in comparison to data calculated from dietary records and available data on levels in food groups. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23, 183-194.
- XU, H., WU, Y., WANG, J., SHANG, X. & JIANG, X. 2013. Simultaneous preconcentration of cadmium and lead in water samples with silica gel and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Environmental Sciences*, 25 Suppl 1, S45-9.
- YUSUF, M., FARIDUDDIN, Q., HAYAT, S. & AHMAD, A. 2011. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 1-17.
- ZAMBELLI, B. & CIURLI, S. 2013. Nickel and human health. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases, Springer, 321-57.
- ZHONG, W.-S., REN, T. & ZHAO, L.-J. 2016. Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24, 46-55.